



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
CAMPUS PARNAÍBA
LICENCIATURA EM QUÍMICA

WELLINGTON SILVA AGUIAR

Estudo químico-biológico das espécies *Coutarea hexandra* (Rubiaceae) e *Annona rugulosa* (Annonaceae)

PARNAÍBA
2022

WELLINGTON SILVA AGUIAR

Estudo químico-biológico das espécies *Coutarea hexandra* (Rubiaceae) e *Annona rugulosa* (Annonaceae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do diploma do Curso de Licenciatura em Química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí. *Campus Parnaíba*.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Buana Carvalho de Almeida
Coorientador: Prof. Dr. Bartholomeu Araújo Barros Filho

PARNAÍBA
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Aguiar , Wellington Silva

A282e Estudo químico-biológico das espécies *Coutarea hexandra* (Rubiaceae)
e *Annona rugulosa* (Annonaceae) / Wellington Silva Aguiar . - 2022.

88 f.: il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) -
Instituto Federal do Piauí, Campus Parnaíba, 2022.

Orientadora : Profª. Dra. Buana Carvalho de Almeida.

Coorientador : Prof. Dr. Bartholomeu Araújo Barros Filho .

1. Química . 2. Análise fitoquímica . 3. *Coutarea hexandra* (Rubiaceae) -
Espécie. 4. *Annona rugulosa* (Annonaceae) - Espécie . 5. Toxicidade. I. Título.

CDD - 540

Elaborado por Micheline Angélica Aragão Gouveia CRB 3/1244

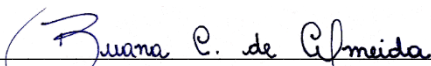
WELLINGTON SILVA AGUIAR

Estudo químico-biológico das espécies *Coutarea hexandra* (Rubiaceae) e *Annona rugulosa* (Annonaceae)

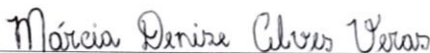
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do diploma do Curso de Licenciatura em Química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí. *Campus Parnaíba*.

Aprovada em: 11/02/2022.

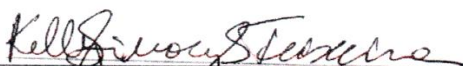
BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Buana Carvalho de Almeida (Orientadora)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI) – *Campus Parnaíba*



Prof^ª. Me. Márcia Denise Alves Veras
Universidade Federal do Piauí (UFPI) – *Campus Teresina*



Prof. Dr^ª Kelly Sivozy Sampaio Teixeira
Centro Universitário Maurício de Nassau (Uninassau) – *Campus Parnaíba*

À família, amigos e professores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família, principalmente meu pai Sebastião Araújo Aguiar e minha mãe Maria Cleonice dos Santos Silva pelo amor incondicional, pela educação e por tudo. Aos meus irmãos Francisco Bruno Silva Aguiar, Samira Hellen Silva Aguiar e Francisco Jhon Saymon Silva Aguiar pelo grande companheirismo, pela força, confiança e por serem uma das minhas maiores motivações, amigos, tudo.

À minha bisa avó Maria pelos abraços apertados e demorados, pelas palavras de carinho e coragem. Aos meus avós Francisco Silva, Lucineide dos Santos, José Aguiar e Maria Eugênia pelo acolhimento e cuidado.

Aos meus tios, principalmente a Crislene Silva, Cristina Aguiar, Ivanilde Silva e Tereza Aguiar pelo acolhimento quando precisei, pelas falas de coragem e motivação.

Aos meus primos e amigos, pelas diversas experiências vividas e, principalmente, ao Eduardo Aguiar Caldas pelo companheirismo desde a infância, experiências, conversas, apoio e risadas (que não foram poucas), desde sempre ao meu lado.

Aos amigos do IFPI, Kenay, Márcio, Warley, Allan, Leonardo Veras, Marcelo, Alicia, Ivany, Rafael, Ana Luiza e Winklei. Ao Diego pelo companheirismo de dividir as contas e o lar comigo, à Natália pela amizade, pelo maravilhoso café, sanduiches, mangas, etc.

Aos professores, à técnica do Laboratório, Isabel e demais servidores do IFPI pelos serviços prestados com excelência e que, grandiosamente, contribuíram para a minha formação e desenvolvimento.

À professora de TCC, Prof^a. Dr^a. Ana Maria Athayde Uchôa Thomaz, pela simpatia e orientações durante a escrita do trabalho.

À minha Orientadora, Prof^a. Dr^a. Buana Carvalho de Almeida e Coorientador Prof. Dr. Bartholomeu Araújo Barros Filho pelas orientações durante a pesquisa, pela confiança, incentivo e os conhecimentos repassados.

À Márcia Denise Alves Vera e ao Laboratório de Produtos Naturais da UFPI, pela realização da atividade antioxidante.

E especialmente, à minha panelinha, Cecília Aguiar, Kamila de Macedo e Luana de Souza. Pela união nos estudos, trabalhos e projetos realizados durante a graduação. Pela vida fora do IFPI, conversas aleatórias e principalmente pelas fofocas, que edificaram, e muito, nossas vidas pessoais e acadêmicas, promovendo entretenimento em meio ao caos.

Talvez, apenas talvez, não há propósito na vida. Mas se você demorar mais algum tempo neste mundo, você pode descobrir algo com valor...".

Orochimaru

RESUMO

As plantas representam uma importante fonte de produtos naturais com uma grande diversidade estrutural e de propriedades químico-biológicas. *Coutarea hexandra* (quina-quina) é uma espécie da família Rubiaceae, na medicina popular, seu extrato aquoso é utilizado no combate a dor, inflamação, como diurético e abortivo. Quanto ao perfil químico, relata-se triterpenos/esteroides, flavonoides, polifenóis, taninos condensados, alcaloides e cumarinas. *Annona rugulosa* (anona) é uma espécie da família Annonaceae, suas folhas já demonstraram significativa atividade antiproliferativa sobre células HeLa. Seu perfil químico é constituído de esteroides, alcaloides e acetogeninas. Dessa forma, este trabalho descreve os constituintes químicos, o potencial antioxidante, teor de flavonoides totais e toxicidade das espécies *Coutarea hexandra* (Rubiaceae) e *Annona rugulosa* (Annonaceae) a fim de contribuir para o conhecimento químico-biológico das mesmas. O procedimento consistiu na realização de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), testes fitoquímicos, extração ácido-base, Cromatografia Preparativa (CP), Cromatografia em Coluna (CC), avaliação do teor de flavonoides totais, atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH•) e toxicidade frente à *Artemia salina*. A CCD sugeriu a presença de flavonoides, terpenoides, açúcares e cumarinas. Os testes fitoquímicos para a *C. hexandra*, evidenciaram a presença de taninos flobatênicos, chalconas e auronas, quinonas, esteroides livres, heterosídeos saponinínicos, alcaloides e cumarinas, para a *A. rugulosa* destacaram-se as classes de taninos flobatênicos, flavonóis, heterosídeos saponínicos, alcaloides e cumarinas. Os extratos EECQ (caule/quina-quina), EEFAQ (folhas/quina-quina), EECA (caule/anona) e EEFA (folhas/anona) apresentaram teor de flavonoides totais iguais a $61,38 \pm 0,11$; $146,96 \pm 1,01$; $27,08 \pm 0,58$ e $105,44 \pm 2,11$ (mg de ER/ g de extrato), respectivamente. A atividade antioxidante (AA%) para o EEFAQ ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi considerada forte, pois apresentou AA% de $75,966 \pm 5,59$ e CE_{50} de $144,20 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 21,63$. Os extratos EECQ ($\text{CL}_{50} = 4168,69 \mu\text{g.mL}^{-1}$), EEFAQ ($\text{CL}_{50} = 80005,71 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e EEFA ($\text{CL}_{50} = 1570,36 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram considerados atóxicos, enquanto o EECA apresentou moderada toxicidade $\text{CL}_{50} = 199,75 (\mu\text{g.mL}^{-1})$. A extração ácido-base dos do EECQ e EECA forneceram as substâncias **1** (10,2 mg), **2** (27,2 mg) e **3** (11,4 mg). As análises qualitativas por CCD dessas substâncias sugerem a identificação de um composto fenólico (flavonoide ou cumarina), um terpeno e uma outra cumarina, respectivamente.

Palavras-chave: Quina-quina. Anona. Metabólitos secundários. Toxicidade

ABSTRACT

Plants represent an important source of natural products with an big structural diversity and chemical-biological properties. *Coutarea hexandra* (quina-quina) is a species of the Rubiaceae family, in folk medicine, its aqueous extract is used in combating pain, inflammation, as diuretic and abortifacient. As for the chemical profile, it is reported that triterpenes/steroids, flavonoids, polyphenols, condensed tannins, alkaloids and coumarins. *Annona rugulosa* (anona) is a species of the Annonaceae family, its leaves have already demonstrated significant antiproliferative activity on HeLa cells. Its chemical profile is made up of steroids, alkaloids and acetogenins. Thus, this work describes the chemical constituents, antioxidant potential, total flavonoid content and toxicity of the species *Coutarea hexandra* (Rubiaceae) and *Annona rugulosa* (Annonaceae) in order to contribute to the chemical-biological knowledge of the same. The procedure consisted of performing Thin Layer Chromatography (TCD), phytochemical tests, acid-base extraction, Column Chromatography (CC), Preparative Chromatography (PC), evaluation of total flavonoid content, antioxidant activity by the free radical scavenging method (DPPH•) and toxicity against *Artemia salina*. The CCD suggested the presence of flavonoids, terpenoids, sugars and coumarins. Phytochemical tests for *C. hexandra* showed the presence of phlobatenic tannins, chalcones and aurones, quinones, free steroids, saponin heterosides, alkaloids and coumarins stood out. For *A. rugulosa* the classes of tannins, phlobatenics, flavonols, saponinic heterosides, alkaloids and coumarins stood out. The EECQ (stem/quina-quina), EEFAQ (leaves/quina-quina), EECA (stem/anona) and EEFA (leaves/anona) extracts showed total flavonoid content equal to 61.38 ± 0.11 ; 146.96 ± 1.01 ; 27.08 ± 0.58 and 105.44 ± 2.11 (mg RE/g extract), respectively. The antioxidant activity (AA%) for EEFAQ ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) was considered strong, as it presented AA% of 75.966 ± 5.59 and EC_{50} of $144.20 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 21.63$. The extracts EECQ ($\text{CL}_{50} = 4168.69 \mu\text{g.mL}^{-1}$), EEFAQ ($\text{CL}_{50} = 80005.71 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and EEFA ($\text{CL}_{50} = 1570.36 \mu\text{g.mL}^{-1}$) were considered nontoxic, while EECA showed moderate toxicity ($\text{LC}_{50} = 199.75 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Acid-base extraction from EECQ and EECA esit provided substances **1** (10.2 mg), **2** (27.2 mg) **3** (11.4 mg). Qualitative analyses by CCD of these substances suggest the identification of a phenolic compound (flavonoid or coumarin), a terpene and another coumarin, respectively.

Keywords: Quina-quina. Anona. Secondary metabolites. Toxicity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura da morfina.	18
Figura 2. Rota biossintética simplificada para a formação dos compostos nitrogenados.	18
Figura 3. Rota biossintética simplificada para a formação dos compostos fenólicos.	20
Figura 4. Núcleo básico dos flavonoides e sua numeração.	21
Figura 5. Estrutura do isopreno.	22
Figura 6. Rota biossintética simplificada para a formação dos terpenos.	22
Figura 7. <i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) k. Schum.	25
Figura 8. Estruturas dos compostos relatados na espécie <i>Coutarea hexandra</i>	28
Figura 9. <i>Annona Rugulosa</i> (Schltdl.) H.Rainer.	31
Figura 10. Estruturas dos compostos relatados na espécie <i>Annona rugulosa</i>	32
Figura 11. Fracionamento cromatográfico do ECICQ-1.	40
Figura 12. Fracionamento cromatográfico do ECICA-1.	41
Figura 13. Local da coleta (A); local da coleta (ícone vermelho) em relação ao povoado Carnaubeiras via <i>Google maps</i> (B).	45
Figura 14. CCD revelada em UV ₃₆₅ (A) e CCD revelada em CeSO ₄ (B).	47
Figura 15. Evidência da presença de taninos flobatênicos nos extratos EECQ (A), EEFAQ (B), EECA (C) e EEFA (D).	50
Figura 16. Reação de complexação de taninos por cloreto férrico.	51
Figura 17. Teste confirmatório pra leucoantocianidinas para EECQ (A), EEFAQ (B), EECA (C) e EEFA (D).	52
Figura 18. Formação do cátion flavílico.	53
Figura 19. Evidência da presença de flavanóis, flavanonas, flavanonois e xantonas nos extratos EECQ (A), EEFAQ (B) e EECA (C).	54
Figura 20. Reação de Shinoda.	54
Figura 21. Evidência da presença de flavanonas nos EECQ (A) e EEFAQ (B).	55
Figura 22. Hidrólise da naringina.	55
Figura 23. Evidência da presença de chalconas e auronas nos EECQ (A) e EEFAQ (B) e flavonóis no EECA (C).	56
Figura 24. Isomerização de uma chalcona em pH básico.	57
Figura 25. Formação de um fenolato.	57
Figura 26. Ensaio de Pacheco para os extratos EECQ (A), EEFAQ (B), EECA (C) e EEFA (D).	58

Figura 27. Evidência de quinonas nos extratos EECQ (A) e EEFQ (B).	59
Figura 28. Reação de Borntrager para a emodina.	59
Figura 29. Evidência de esteroides livres nos extratos EEFQ (A) e EEFA (B).	60
Figura 30. Reação para a identificação de esteroides.	61
Figura 31. Evidência de saponinas nos extratos EECQ (A), EEFQ (B), EECA (C) e EEFA (D).	62
Figura 32. Identificação de alcaloides nos extratos EECQ (A), EEFQ (B), EECA (C) e EEFA (D).	62
Figura 33. Formação de precipitados nos extratos EECQ (A e B) e EECA (C e D) pelos reagentes de Dragendorff e de Wagner, respectivamente.	63
Figura 34. Formação de um sal complexo entre um alcaloide e os reagentes de Dragendorff e Wagner.	64
Figura 35. Evidência de cumarinas a partir de fluorescência verde em UV 254 para os EECQ (A) e EEFQ (B) e 365 nm para os extratos EECA (C) e EEFA (D).	65
Figura 36. Reação de formação e isomerização do ácido <i>cis</i> -hidroxicinâmico.	65
Figura 37. CCD dos extratos EClCQ-1, EClCQ-2, EClCA-1 e EClCA-2 reveladas em UV 365 nm (A), sulfato cérico (B) e Dragendorff (C).	66
Figura 38. CCD da substância 1 revelada em luz UV 365 nm (A) e sulfato cérico (B).	68
Figura 39. Precipitado do grupo de frações II antes (A) e depois (B) da lavagem com hexano e acetato de etila.	68
Figura 40. CDD revelada em luz UV 365 nm (A) e sulfato cérico (B) do precipitado e lavagens do grupo de frações II.	69
Figura 41. PC da amostra EClCA-1 revelada em UV 365 nm.	70
Figura 42. CCD da substância 3 revelada em luz UV 365 nm (A) e sulfato cérico (B).	70
Figura 43. Reação de complexação flavonoide-Al ³⁺	71
Figura 44. Reação de redução do DPPH•.	73

LISTA DE GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

GRÁFICOS

Gráfico 1. Comportamento cinético do EEFQ (250 µg mL ⁻¹) frente ao DPPH• remanescente.	74
--	----

QUADROS

Quadro 1. Classes de constituintes químicos identificados no extrato etanólico das folhas e caules de <i>Coutarea hexandra</i>	48
Quadro 2. Classes de constituintes químicos identificados no extrato etanólico das folhas e caules de <i>Annona rugulosa</i>	49

TABELAS

Tabela 1. Precursores, classes, exemplos, fontes e uso humano de alcaloides.	19
Tabela 2. Condensação das unidades isoprênicas na formação das classes dos terpenos e exemplos.	23
Tabela 3. Atividades biológicas relatadas na espécie <i>Coutarea hexandra</i>	26
Tabela 4. Constituintes químicos relatados na espécie <i>Coutarea hexandra</i>	27
Tabela 5. Rendimento dos extratos das espécies estudadas.	46
Tabela 6. Teor de flavonoides totais para os extratos das espécies estudadas.	72
Tabela 7. Teor de inibição do DPPH• (AA%) para o EEFQ e controles (rutina e BTH) após 30 min de reação.	73
Tabela 8. Toxicidade dos extratos EECQ, EEFQ, EECA e EEFA frente a <i>A. salina</i>	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 METABOLISMO VEGETAL	17
2.1.1 Metabólitos secundários	17
2.2 TAXONOMIA DAS ESPÉCIES ESTUDADAS	23
2.2.1 Família Rubiaceae	24
2.2.2 Gênero <i>Coutarea</i>	24
2.2.3 Espécie <i>Coutarea hexandra</i>	25
2.2.4 Família Annonaceae	30
2.2.5 Gênero <i>Annona</i>	31
2.2.6 Espécie <i>Annona rugulosa</i>	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 METODOLOGIA	35
4.1 TIPO DA PESQUISA	35
4.2 COLETA DAS ESPÉCIES	35
4.3 PROCEDIMENTO DA PESQUISA	35
4.3.1 Preparação dos extratos	35
4.3.2 Cromatografia em Camada Delgada	36
4.3.3 Testes fitoquímicos para metabólitos secundários	36
4.3.3.1 Preparo das soluções	36
4.3.3.2 Testes para fenóis e taninos	36
4.3.3.3 Testes para antocianinas, antocianidinas e flavonoides	36
4.3.3.4 Testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas	37
4.3.3.5 Teste para flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas	37
4.3.3.6 Teste confirmatório para leucoantocianidinas	37
4.3.3.7 Teste confirmatório para diidroflavonois – Ensaio de Pacheco	38
4.3.3.8 Teste para quinonas	38

4.3.3.10	Teste para heterosídeos saponínicos	38
4.3.3.11	Teste para alcaloides	38
4.3.3.12	Teste para alcaloides e cumarinas	39
4.3.4	Extração ácido-base e isolamento	39
4.3.4.1	Extração ácido base.....	39
4.3.4.2	Isolamento das substâncias dos extratos clorofórmicos	40
4.3.5	Avaliação do teor de flavonoides	41
4.3.5.1	Construção da curva de calibração.....	41
4.3.5.2	Determinação de flavonoides totais	41
4.3.6	Atividades biológicas	42
4.3.6.1	Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH•)	42
4.3.6.1.1	<i>Leitura das medidas de absorbância das amostras.....</i>	<i>42</i>
4.3.6.1.2	<i>Análise estatística</i>	<i>43</i>
4.3.6.2	Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	43
4.4	TRATAMENTO DOS DADOS	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	COLETA DAS ESPÉCIES	45
5.2	RENDIMENTO DOS EXTRATOS	45
5.3	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	47
5.4	TESTES FITOQUÍMICOS PARA METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	48
5.4.1	Taninos.....	50
5.4.2	Leucoantocianidinas	51
5.4.3	Flavonóis, flavanonas, flavanonois e xantonas	53
5.4.4	Flavanonas.....	54
5.4.5	Chalconas, auronas e flavonóis	56
5.4.6	Diidroflavonois.....	57
5.4.7	Quinonas	58
5.4.8	Esteroides livres.....	59
5.4.9	Heterosídeos Saponínicos.....	61
5.4.10	Alcaloides.....	62
5.4.11	Cumarinas	64

5.5 EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE	66
5.5.1 Cromatografia em Coluna (CC) de gel de sílica	67
5.5.2 Cromatografia Preparativa (CP) – gel de sílica	69
5.6 AVALIAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS	71
5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES (DPPH•)	72
5.8 TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	74
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Nas civilizações antigas, havia uma dependência fundamental entre os seres humanos e a natureza. Dessa forma, utilizava-se principalmente das plantas medicinais para cura. O conhecimento dos benefícios associados ao uso dessas plantas é tão antigo quanto a própria história humana e não se sabe ao certo quando exatamente surgiu. No entanto, sabe-se que surgiu ao passo que o homem primitivo tentava suprir suas necessidades básicas por meio de casualidades, tentativas e observações, sendo esses os pilares do empirismo (ALMEIDA, 2011).

As observações populares a respeito da utilização de plantas medicinais contribuem relevantemente para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais. Isso ocasiona o acúmulo secular de informações terapêuticas, validadas pela prática de consumo de fitoterápicos em todo o mundo. Ademais, apesar dessas informações, muitas vezes não se tem o conhecimento da composição química dessas plantas, o que, de certa forma, desperta o interesse de pesquisadores da área de Química de Produtos Naturais (QPN) a identificarem e caracterizarem tais constituintes (metabólitos secundários), os quais são os responsáveis pelas propriedades biológicas das plantas (MACIEL et al., 2002).

No Brasil, a QPN é a área da química mais antiga, agregando um grande número de pesquisadores (PINTO et al., 2002). Existe uma inacreditável diversidade estrutural e de propriedades químico-biológicas dos produtos naturais, onde as plantas representam uma importante fonte desses produtos, muitos dos quais até servem de modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Vale ressaltar, que apesar dos avanços ocorridos nos processos de síntese, o mesmo ainda é limitado em termos de complexidades estruturais atribuídas às substâncias sintetizadas, já os produtos de origem natural têm uma diversidade estrutural superior (GUERRA; NODARI, 2007).

O desenvolvimento de novos medicamentos a partir dos recursos vegetais representa, na verdade, um valor econômico-estratégico inestimável. O Brasil, por apresentar a maior biodiversidade do mundo, cerca de 20% do total de espécies do planeta, torna-se um país com grande potencial para investir nessa atividade (CALIXTO, 2003). Corroborando com isso, Guerra e Nodari (2007) abordam que a biodiversidade brasileira, em toda a sua complexidade, não é conhecida com precisão, com um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies, sendo que mais da metade dessas plantas se encontram em florestas tropicais. Esse fator eleva as chances de se encontrar produtos naturais com importância econômica, como os fitoterápicos e os fitofármacos.

Terra Junior, Maldonado e Arnóbio (2015) analisaram os valores de exportação e importação de insumos farmacêuticos vegetais no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2014 e verificaram que o Brasil apresenta grande dependência externa. Um verdadeiro contrassenso para um país considerado detentor de uma grande biodiversidade. Além do seguimento farmacológico, o reino vegetal pode contribuir de forma significativa para o fornecimento de metabólitos secundários com grande valor agregado devido a suas aplicações como cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al., 2002).

Assim, o desenvolvimento de pesquisas para explorar as potencialidades das plantas brasileiras torna-se importante. Segundo Sousa et al. (2017), apenas uma pequena fração é utilizada para pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Dessa forma, se faz necessário o estudo das espécies *Coutarea hexandra* (Rubiaceae) e *Annona rugulosa* (Annonaceae), plantas conhecidas na região do Delta do Parnaíba por apresentar potenciais terapêuticos. Uma pesquisa realizada na base de dados do *Web of Science* demonstrou que essas plantas ainda são pouco estudadas, com 23 artigos atribuídos à espécie *Coutarea hexandra*, dispostos em categorias como química orgânica (2 artigos), farmacologia (5 artigos) e química medicinal (5 artigos). Já para a espécie *Annona rugulosa* apenas 1 artigo abordando o isolamento de constituintes químicos do extrato hidroalcoólico das folhas.

A partir disso, percebe-se que há uma carência de estudos envolvendo essas espécies, principalmente em relação à *A. rugulosa*, o que motivou a realização da pesquisa que, então, busca contribuir com informações sobre a constituição química dessas plantas, bem como seus potenciais biológicos. E com isso, valorizar a biodiversidade do Delta do Parnaíba, uma região onde não há nenhum estudo com essas espécies.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 METABOLISMO VEGETAL

O metabolismo é um conjunto de reações químicas que ocorrem a todo momento nas células. Enzimas específicas controlam a direção dessas reações fazendo as mesmas seguirem, o que se denomina rotas metabólicas. O objetivo dessas reações, inicialmente, é o aproveitamento dos nutrientes para atender às necessidades básicas das células: energia, poder redutor e a biossíntese das substâncias imprescindíveis para a sobrevivência do vegetal, as quais compõem o metabolismo primário (DOS SANTOS, 2007).

Os carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos são metabólitos primários formados a partir de rotas biossintéticas essencialmente iguais para os vários organismos vivos, com pequenas variações. São unidades básicas constituintes de qualquer matéria viva, portanto são abundantes na natureza. Paralelamente, existe vias que levam a formação de compostos de ocorrência limitada na natureza, os chamados metabólitos secundários (DEWICK, 2009).

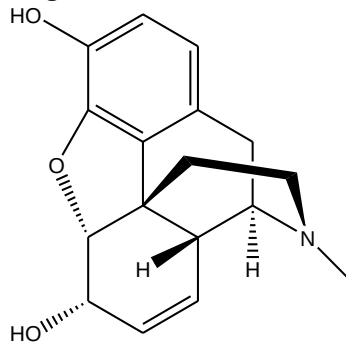
2.1.1 Metabólitos secundários

No metabolismo secundário vegetal, vários compostos orgânicos são biossintetizados a partir dos metabólitos primários. Esses metabólitos podem ser classificados em três principais classes, a dos compostos nitrogenados, compostos fenólicos e terpenos ou terpenoides (DELBONE; LANDO, 2010 *apud* CUNHA et al., 2016). Como características, apresentam estruturas complexas, baixo peso molecular e propriedades biológicas importantes (BERG; LUBERT, 2008). Nas plantas, desempenham o papel de proteção contra herbívoros, microorganismos e raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e participação em alelopatias (DOS SANTOS, 2007).

Os compostos nitrogenados englobam os alcaloides, glicosídeos cianogênicos e aminoácidos não proteicos, sendo o primeiro grupo, o principal e mais importante. Os alcaloides compreendem uma classe quimicamente diversa, contendo um átomo de nitrogênio em um ou mais heterociclos carbônicos e são amplamente encontrados em plantas vasculares (ALMEIDA-BEZERRA et al., 2020). Como o nitrogênio geralmente é uma amina primária, secundária ou terciária, a maioria dos alcaloides apresenta caráter básico. São conhecidos pela grande aplicabilidade farmacológica e, por isso, comumente correspondem aos princípios

ativos em plantas medicinais. A exemplo dessa classe, tem-se a morfina (FIGURA 1) encontrada na espécie *Papaver somniferum* (Papaveraceae) (DE REZENDE et al., 2016).

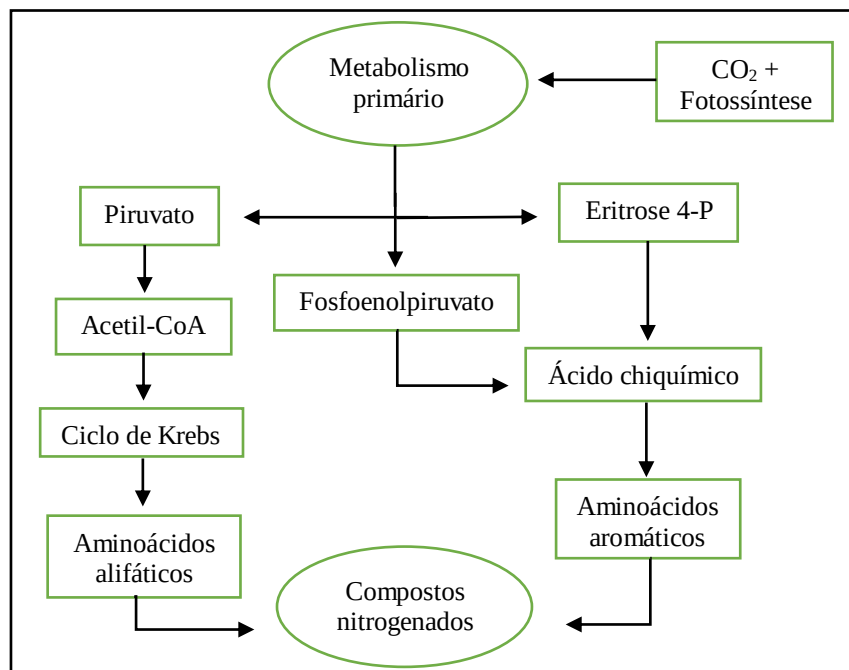
Figura 1. Estrutura da morfina.



Fonte: Adaptado de Henriques et al. (2007).

Quanto a biossíntese, que depende do metabolismo primário, esses compostos são derivados de duas rotas, a do ciclo do ácido tricarboxílico ou ciclo de Krebs e a rota do ácido chiquímico. Nessas rotas, são formados os aminoácidos alifáticos e os aminoácidos aromáticos, ambos, são os precursores dos compostos nitrogenados, como os alcaloides, que são formados por reações simples e repetitivas (BORGES; AMORIM, 2020). No esquema a seguir, é possível observar, de forma objetiva, a biossíntese dessa classe de substâncias na célula vegetal:

Figura 2. Rota biossintética simplificada para a formação dos compostos nitrogenados.



Fonte: Adaptado de Anulika et al. (2016) *apud* Borges e Amorim (2020).

A classificação dos alcaloides se dar a partir do seu aminoácido precursor, o qual o confere o esqueleto fundamental da estrutura contendo o(s) átomo(s) de nitrogênio (GOMES, 2017). Dentre os aminoácidos, pode-se citar a lisina e ornitina (alifáticos), a tirosina e triptofano (aromáticos). A partir da lisina, são formados os alcaloides quinolizidínicos, indolizidínicos e piperidínicos; da ornitina, os tropânico, pirrolidínicos e pirrolizidínicos; da tirosina, os aporfínicos, tetraidroisoquinolínicos, isoquinolínicos, benziltetraidroisoquinolínicos, morfínicos e os protobeberínicos e do triptofano, os quinolínicos, β -carbonílicos, pirroloindólicos, indólicos e os pirroloquinolínicos (DE REZENDE et al., 2016).

Nos seres humanos, essas substâncias produzem respostas fisiológicas e psicológicas como consequência da interação com neurotransmissores. A variedade estrutural das diferentes classes está relacionada com o amplo espectro de atividades biológicas (FERREIRA, 2016). A seguir, pode-se observar algumas informações sobre precursor, classe, exemplo, fonte e uso de alguns desses compostos:

Tabela 1. Precursores, classes, exemplos, fontes e uso humano de alcaloides.

Precursor	Classe	Exemplo	Fonte	Uso humano
Lisina	Quinolizidínicos	Lupinina	<i>Lupinus luteus</i>	Restauração do ritmo cardíaco
	Indolizidínicos	Castanospermina	<i>Castanospermum australe</i>	Antiviral
	Piperidínicos	Coniína	<i>Cicuta sp.</i>	Parada respiratória
Ornitina	Tropânico	Cocaína	<i>Erythroxylum coca</i>	Anestésico e droga de abuso
	Pirrolidínicos	Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	Droga de abuso
	Pirrolizidínicos	Retronescina	<i>Senecio sp.</i>	Toxicidade hepática
Tirosina	Aporfínicos	Boldina	<i>Peumus boldus</i>	Problemas digestivos e hepáticos
	Isoquinolínicos	Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	Potente analgésico
Triptofano	Quinolínicos	Quinina	<i>Cinchona succirubra</i>	Antimalárico
	Indólicos	Reserpina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Hipertensão

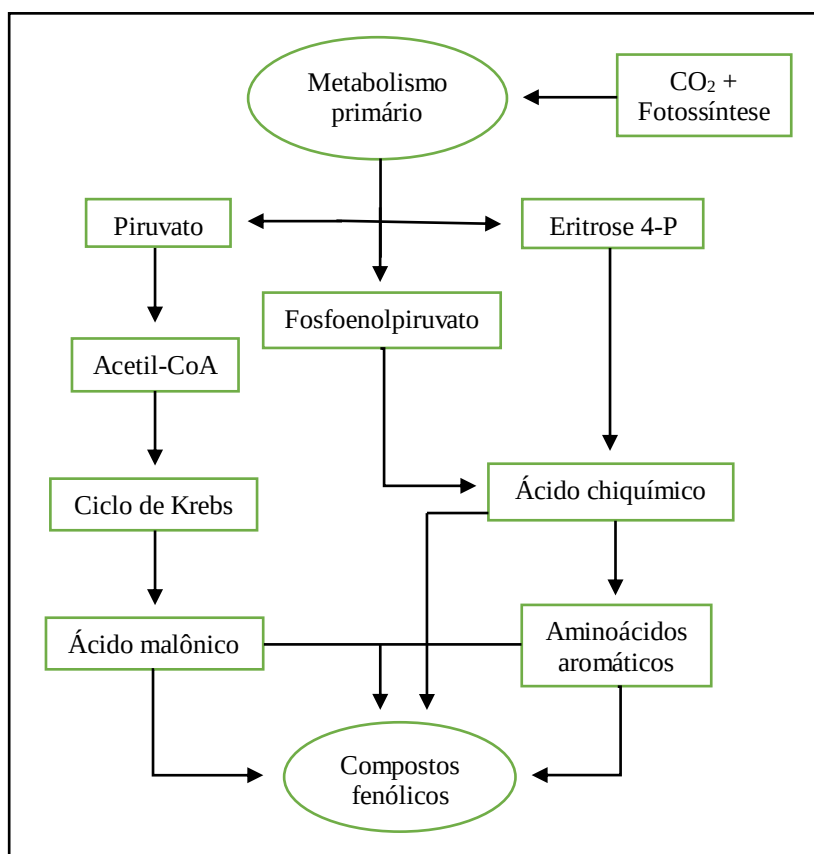
Fonte: Adaptado de De Rezende et al. (2016).

Os compostos fenólicos compreendem a classe de substâncias que apresentam pelo menos um anel aromático onde, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila. São amplamente distribuídos nas plantas e podem servir como marcador quimiotaxonômico de

diversas espécies vegetais, como os flavonoides (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007). Essa classe de metabólitos secundários é essencial para o desenvolvimento da planta, além de apresentar capacidade de interagir com espécies radicalares, atuando como antioxidantes naturais (RAMALHO; JORGE, 2006 *apud* CUNHA et al., 2016).

Na biossíntese dos compostos fenólicos, a maioria das substâncias é derivadas da fenilalanina, um aminoácido aromático, formado na via do ácido chiquímico. No entanto, em algumas espécies de vegetais, a rota do ácido malônico também tem relevância para a produção de tais compostos (BORGES; AMORIM, 2020). Com isso, no esquema a seguir, pode-se observar, de forma simplificada, a biossíntese dos compostos fenólicos:

Figura 3. Rota biossintética simplificada para a formação dos compostos fenólicos.



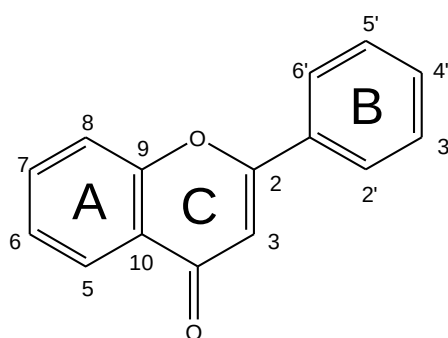
Fonte: Adaptado de Castro et al. (2004) *apud* Freitas (2018).

Os compostos fenólicos são classificados a partir de seus esqueletos principais: fenóis simples e benzoquinonas (C6); ácidos fenólicos (C6-C1); acetofenonas e ácidos fenilacéticos (C6-C2); ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas (C6-C3); naftoquinonas (C6-C4); xantonas (C6-C1-C6); estilbenos e antraquinonas

(C6-C2-C6); flavonoides e isoflavonoides (C6-C3-C6); lignanas (C6-C3)₂; diflavonoides (C6-C3-C6)₂; melaninas vegetais (C6)_n; ligninas (C6-C3)_n; taninos hidrolisáveis (C6-C1)_n e taninos condensados (C6-C3-C6)_n. Dentre essas classes, a dos flavonoides é a principal e mais importante (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Os flavonoides são substâncias aromáticas contendo 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico. A estrutura básica é formada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (C), caracterizando um sistema C6-C3-C6 (FIGURA 4). Muitos compostos distintos dessa classe já foram identificados, a variedade se dá pelas diferentes combinações que grupos metil e hidroxil podem substituir os hidrogênios da estrutura básica (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Essa variedade estrutural faz com que, os mesmos, desempenham muitos papéis no vegetal, como defesa contra herbívoro e patógenos e confere pigmentos atrativos para polinizadores e dispersores de sementes (BORGES; AMORIM, 2020).

Figura 4. Núcleo básico dos flavonoides e sua numeração.



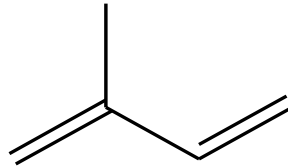
Fonte: Adaptado de Zuanazzi e Montanha (2007).

Os flavonoides, por sua vez, podem ocorrer em diferentes formas sendo classificados em sete grupos: flavonas, flavanonas, flavonois, flavanonois, isoflavonas, flavanois (catequinas) e antocianidinas (SHAHIDI; HO, 2007 *apud* PEREIRA; CARDOSO, 2012). Apesar da classificação, a maioria apresenta 15 átomos de carbono no núcleo fundamental das duas fenilas unidas por três carbonos, frequentemente estão oxigenados e uma grande parte conjugados com açúcares (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Os terpenos ou terpenoides formam uma grande família de produtos naturais, estruturalmente diversa, derivados do isopreno (C5) (Figura 5). As unidades de isopreno se unem de ponta a ponta gerando estruturas com esqueletos representados basicamente por (C5)_n (DEWICK, 2009). Quimicamente, os terpenos designam as estruturas definidas como “alcenos

naturais” contendo apenas carbono e hidrogênio, no entanto, quando há átomos de oxigênio como em grupos ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxido terpênicos, essas substâncias passam a ser chamadas de terpenoides (FELIPE et al., 2017).

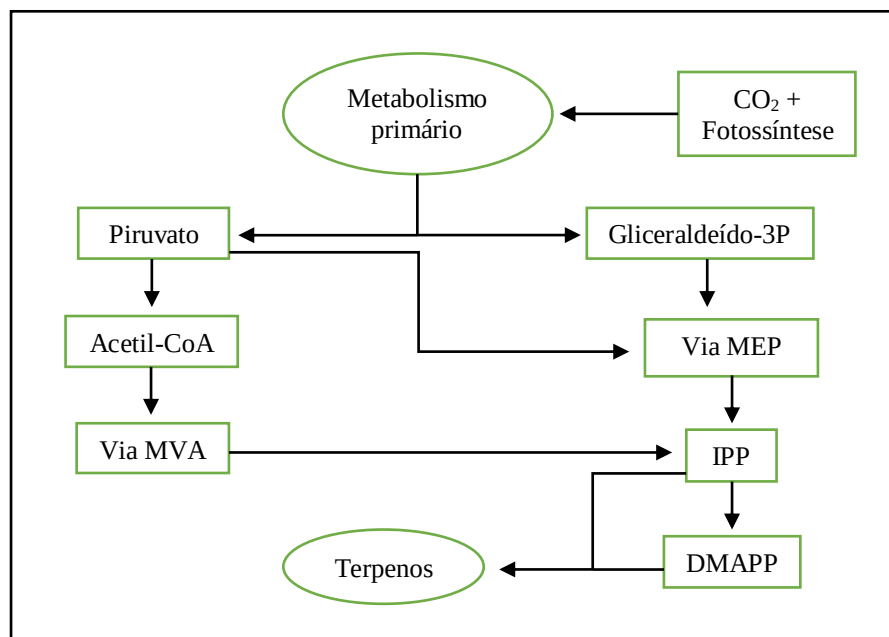
Figura 5. Estrutura do isopreno.



Fonte: Adaptado de Oliveira (2019).

Os terpenos são formados a partir da rota do ácido mevalônico (MVA), proveniente da união de unidades de acetil-CoA e da rota do meritritol fosfato (MEP), proveniente de unidades de piruvato e gliceraldeído-3P. Ambas as rotas MVA e MEP, originam os precursores imediatos dessa classe, o pirofosfato de isopentenila (IPP) e o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) (CONNOLLY; HILL, 1991 *apud* FERREIRA, 2014). A seguir, é possível observar na Figura 6 o esquema da biossíntese simplificada para a formação dos terpenos.

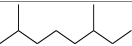
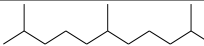
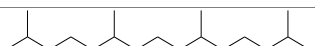
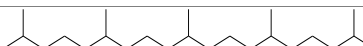
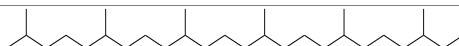
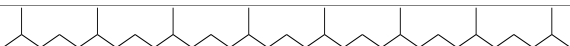
Figura 6. Rota biossintética simplificada para a formação dos terpenos.



Fonte: Adaptado Dewick (2009) e Castro et al. (2004) *apud* Freitas (2018).

Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas (C₅) unidas para a formação da estrutura do composto. Desta forma, podem ser divididos em monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C) (voláteis), diterpenos (20C), sesterpenos (25C), triterpenos (30C), tetraterpenos (40C) e os politerpenos (>40C) (não voláteis) (HEMMERLIN et al., 2012 *apud* KORTBEEK; GRAGT; BLEEKER, 2019). Na Tabela 2 a seguir, observa-se a condensação das unidades de isopreno, a classificação e exemplos de cada classe dos terpenos:

Tabela 2. Condensação das unidades isoprênicas na formação das classes dos terpenos e exemplos.

Nº de unidades de isopreno	Nº de átomos de carbono		Classe	Exemplo
2	10		Monoterpenos	Limoneno
3	15		Sesquiterpenos	Farneseno
4	20		Diterpenos	Esteviosídeo
5	25		Sesterpenos	Ofiobolina A
6	30		Triterpenos	Esqualeno
8	40		Tetraterpenos	β-Caroteno
n	>40	$\left[\text{isopreno} \right]_n$	Politerpenos	Látex

Fonte: Adaptado de Simões e Spitzer (2007), Felipe et al. (2017) e Dewick (2009).

Nos vegetais, os terpenos desempenham diversas funções, como os monoterpenos que atuam para a atração de insetos polinizadores e os sesquiterpenos com atividades inseticida e antibacteriana, ambos os grupos são constituintes dos óleos essenciais das plantas (OLIVEIRA, 2008 *apud* SOUZA, 2017). Os diterpenos, podem atuar como hormônios na germinação de sementes, alongamento caulinar e expansão de frutos de muitas espécies (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). Os triterpenos (esteróis) podem atuar como hormônios e componentes de membrana, os tetraterpenos (carotenóides) como pigmentos fotossintéticos e antioxidantes (KESSLER; BALDWIN, 2001 *apud* FARIAS, 2019). Além disso, representam um considerável valor comercial nas indústrias farmacêuticas, cosmética e alimentícia (DE MOURA; MARTINS; DA SILVA, 2019).

2.2 TAXONOMIA DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

A taxonomia vegetal é o ramo da ciência responsável pela classificação, nomeação e identificação das espécies vegetais (LOPES; SILVANO; BEGOSSI, 2010). O agrupamento das espécies é feito de acordo com o seu grau de semelhança, de forma a buscar relações de parentesco entre as espécies que existem e seus ancestrais extintos (GOMES et al., 2017). Saber o nome científico da espécie é a base para qualquer investigação científica, assim vários estudos em diferentes lugares ou épocas podem ser realizados e atribuídos a mesma planta. Na taxonomia, o nome da espécie designa-se pelo nome do gênero seguido de um epíteto específico, com ambos os termos escrito em itálico. Um conjunto de espécies semelhantes é designado gênero, por sua vez, os gêneros semelhantes são agrupados em famílias, as quais recebem o nome do gênero mais antigo, seguido do sufixo “aceae” (MARTINS-DA-SILVA et al., 2014).

2.2.1 Família Rubiaceae

Essa família ocupa o quarto lugar em diversidade entre as Angiospermas, contando, atualmente, com 13.765 espécies agrupadas em 611 gêneros, apesar disso, acredita-se que ainda existam 3 mil espécies desconhecidas para a ciência, o que eleva a estimativa para mais de 16 mil espécies. A família compreende ervas, arbustos, arvoretas, árvores de médio porte e mais raramente lianas ou epífitas. No Brasil, está entre as dez famílias mais diversa da flora, com cerca de 126 gêneros e 1.406 espécies, ocorrendo no Nordeste, 83 gêneros compreendendo 412 espécies (FONSECA et al., 2020). É considerada uma das famílias mais importantes da flora brasileira para fins terapêuticos, mas também economicamente e ornamentalmente (SOUSA; CHAVES, 2019).

2.2.2 Gênero *Coutarea*

Para o gênero *Coutarea*, a maioria dos estudos refere-se a sua distribuição, filogenia e ecologia. Na América Latina, do México a Argentina, consta-se distribuídos seis espécies desse gênero e, apenas duas delas, a *C. latiflora* e *C. hexandra*, são utilizadas na medicina popular. Dentre as atividades biológicas relatadas, estão: abortiva, antimalárica, anti-inflamatória e antidiabética. Já nos estudos referentes a constituição química, é relatado a presença de flavonoides, cumarinas e derivados de cucurbitacinas (LIMA, 2009).

2.2.3 Espécie *Coutarea hexandra*

Coutarea hexandra (FIGURA 7) é uma planta arbórea amplamente distribuída no Brasil, principalmente em regiões úmidas da Amazônia e Mata Atlântica. Essa espécie se apresenta como uma árvore de 3 a 5 metros de altura, tronco tortuoso e copa globosa, com inflorescência rósea motivando seu uso como planta ornamental (CARVALHO, 2009). Popularmente, é conhecida como: “quina-quina” no Nordeste, “murta-do-mato” em Minas Gerais e “quina-quina-branca, quina-do-Pará, quina-do-Piauí e amora-do-mato” em São Paulo (LIMA, 2009).

Figura 7. *Coutarea hexandra* (Jacq.) k. Schum.



Fonte: Carvalho (2009).

Na medicina popular, o chá da entrecasca é bastante utilizado no combate a dor e a inflamação e como diurético e abortivo (LUCENA et al., 2006). Além disso, há indicações em estudos etnomédicos das cascas do caule para febre intermitente, pedras na vesícula ou problemas digestivos, cólicas, possuindo também propriedades antitérmica e antimalárica. É importante ressaltar a propriedade antimalárica dessa planta demonstrada em pacientes com a doença sob observação clínica. O Dr. Monteiro da Silva relata a cura da malária através da *Coutarea hexandra*, alguns casos são descritos no livro de botânica médica cearense do Dr. Francisco Dias da Rocha (BOTSARIS, 2007). Corroborando com isso, no município de Vilhena, em Rondônia, os moradores utilizam as cascas de quina-quina para tratar dor de barriga e febre (LIMA; MAGALHÃES; DOS SANTOS, 2011). Na Tabela 3 a seguir, pode-se observar as propriedades biológicas verificadas para essa espécie:

Tabela 3. Atividades biológicas relatadas na espécie *Coutarea hexandra*.

Atividade/Concentração ou doses	Parte da planta	Extratos	Referências
Antimicrobiana			
-Bactérias: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Bordetella bronchiseptica</i> (500 µg/mL); -Fungos: <i>Trichophyton rubrum</i> e <i>Microsporum canis</i> (500 µg/mL); -Levedura: <i>Cryptococcus neoformans</i> (500 µg/mL).	Casca do caule	MeOH	Araújo et al., 1988.
Anti-inflamatória			
IG, ratos, 500 µg/Kg vs. Carragenina	Casca do caule	EtOH (95%)	Almeida; Santana; Mello, 1991 <i>apud</i> Lima, 2009.
Antinociceptivo			
Camundongos e ratos (100, 200 e 400 mg/Kg)	Entrecasca	Aquoso	Lucena et al., 2006.
Antiedematogênica			
Camundongos 0,6; 1,0; 0,05 mg/orelha vs. Óleo de crôton	Raízes	EtOH (90%)	Lima, 2009.
Antioxidante			
-EEC ^a (IC ₅₀ 87,46 µg/mL) -EEF ^b (IC ₅₀ 99,57 µg/mL)	Casca do caule e Folhas	EtOH (95%)	Nunes et al., 2012.
-EEC ^a (IC ₅₀ 43,78 µg/mL) -EEF ^b (IC ₅₀ 12,24 µg/mL) -EER ^c (IC ₅₀ 46,05; 27,82; 20,58; 14,81; 12,69 µg/mL) vs. DPPH	Raízes, folhas e casca o caule	EtOH (90%)	Lima, 2009.
Anticolinesterásica			
IC ₅₀ 46,05; 27,82; 14,81; 12,69 µg/mL vs. Enzima AChE ^d	Raízes	EtOH (90%)	Lima, 2009.
Mutagênica			
<i>S. Typhimurium</i> TA98 (2,06; 4,12; 8,25; 12,37 e 16,50 mg/placa)	Casca do caule e Folhas	EtOH (95%)	Nunes et al., 2012.
Moluscicida			
<i>Biophalaria straminea</i> (100 ppm)	Casca do caule	Aquoso quente	Silva; Sousa; Rouquayrol, 1971 <i>apud</i> Lima, 2009.
Citotóxica			
Cultura de células (DE ₅₀ 1,8 µg/mL CA-9KB)	-	EtOH (95%)	Suffness et al., 1988.
Cultura de células (DE ₅₀ 11 µg/mL CA-9KB)	-	Fração cromatográfica	Nascimento; Mello; Chiappeta, 1985 <i>apud</i> Lima, 2009.
Efeito tóxico			
- IP, ratos, 200 µg/Kg, Leuk-P388; 112 µg/Kg, Colon 38; 200 µg/Kg, Melanoma-B16	-	EtOH (95%)	Suffness et al., 1988.
<i>Aedes aegypti</i> (período pupal) 30, 60, 125, 250 e 500 mg/mL	Casca do caule	EtOH (90%)	Candido; Cavalcante; Beserra, 2013.

Fonte: O autor (2021).

a: Extrato Etanólico do Caule; b: Extrato Etanólico das Folhas; c: Extrato Etanólico das Raízes; d: Enzima acetilcolinesterase.

Já em relação ao perfil químico, Olmebo et al. (2007) destaca que os constituintes químicos mais comuns isolados de *Coutarea hexandra* são as fenilcumarinas. Além disso, Nunes et al. (2012) avaliou o perfil fitoquímico dos extratos etanólico do caule (EEC) e folhas (EEF) dessa planta a partir de cromatografia em sílica gel GF 254 e Cromatografia Líquida de

Alta Eficiência (CLAE) evidenciando a presença de triterpenos/esteroides, flavonoides, polifenóis e taninos condensados em ambos os extratos, já alcaloides e cumarinas foram detectados apenas no EEC. Carvalho (2009) corrobora com essas evidências em seu estudo através de Cromatografia em Camada Delgada CCD. Na Tabela 4 abaixo, é possível verificar os constituintes já relatados para esta espécie seguida das formulas estruturais na Figura 8.

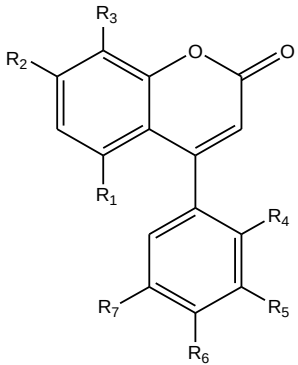
Tabela 4. Constituintes químicos relatados na espécie *Coutarea hexandra*.

Substâncias	Parte da planta	Extratos	Referências
1. 3',4'-Diidroxi-5,7-dimetoxi-4-fenilcumarina	Caule	Benzênico	Monache et al., 1983.
2. 3'-Hidroxi-4',5,7-trimetoxi-4-fenilcumarina	Caule	Benzênico	Monache et al., 1983.
3. 4'-Hidroxi-5,7-dimetoxi-4-fenilcumarina	Caule	Benzênico	Monache et al., 1983.
4. 4',5,7-Trimetoxi-4-fenilcumarina	Caule	Benzênico	Monache et al., 1983.
	Raízes	EtOH (90%)	Lima, 2009.
5. Coutareagenina	Casca do caule	MetOH	Reher et al., 1983.
6. 5,7-Dimetoxi-3',4'-metilenodioxo-4-fenilcumarina	Caule	Benzênico	Monache; Botta; Lima, 1984.
7. 8-Hidroxi-4',5,7-trimetoxi-4-fenilcumarina	Caule	Benzênico	Monache et al., 1987.
	Raízes	EtOH (90%)	Lima, 2009.
8. 5,7,8,4'-Tetrametoxi-4-fenilcumarina	Caule	Benzênico	Monache et al., 1987.
9. 3',4',5-Triidroxi-7-metoxi-neoflavona	-	-	Iinuma et al., 1987.
10. 2',5',5,7-Tetraacetoxi-4-fenilcumarina	Casca do caule	MetOH	Araújo, 1986 <i>apud</i> Araújo et al., 1988.
11. Celotenina	Casca do caule	MetOH	Araújo; Paulo, 1986 <i>apud</i> Araújo et al. 1988.
12. 5-O-(β-D-Glicopiranosil)-7,3',4'-triidroxi-4-fenilcumarina	Caule	MetOH	Aquino et al., 1988.
13. 5-O-(β-D-Glicopiranosil)-7-metoxi-3',4'-diidroxi-4-fenilcumarina	Caule	MetOH	Aquino et al., 1988.
14. 5-O-[β-D-Apiofuranosil-(1→6)-β-glicopiranosil]-7-metoxi-3',4'-diidroxi-4-fenilcumarina	Caule	MetOH	Aquino et al., 1988.
15. 5-O-[β-D-Xilopiranosil-(1→6)-β-glicopiranosil]-7,3',4'-triidroxi-4-fenilcumarina	Caule	MetOH	Aquino et al., 1988.
16. 3',4',7-Triidroxi-5-metoxi-neoflavona	Caule	-	Monache et al., 1989 <i>apud</i> Lima, 2009.
17. 8-Hidroxi-3',4',5,7-tetrametoxi-4-fenilcumarina	-	MetOH	D'agostino et al., 1989a.
18. 3',4',8-Triidroxi-5,7-dimetoxi-4-fenilcumarina	Caule	MetOH	D'agostino et al., 1989b.
19. 3',8-Diidroxi-4',5,7-trimetoxi-4-fenilcumarina	Caule	Benzênico	Monache et al., 1990.
	Caule	MetOH	D'agostino et al., 1990
20. 3'-Hidroxi-4',5,7,8-tetrametoxi-4-fenilcumarina	Caule	Benzênico	Monache et al., 1990.

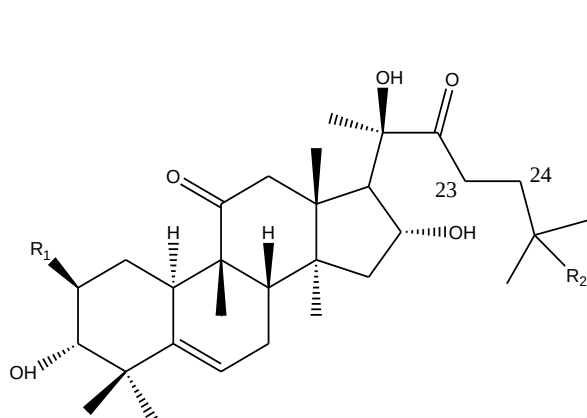
21.	5-O-β-D-Glicopiranosil-7-metoxi-4'-hidroxi-4-fenilcumarina	Frutos	EtOH (80%)	Olmedo et al., 2007.
22.	5-O-β-D-Galactopiranosil-7-metoxi-4'-hidroxi-4-fenilcumarina	Frutos	EtOH (80%)	Olmedo et al., 2007.
23.	3',4'-Diidroxi-5,7,8-trimetoxi-4-fenilcumarina	Raízes	EtOH (90%)	Lima, 2009.
24.	5,7-Dimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina	Raízes	EtOH (90%)	Lima, 2009.
25.	5-Hidroxi-7-metoxi-4-(p-hidroxifenil)cumarina:	Raízes	EtOH (90%)	Lima, 2009.
26.	Ácido ascórbico	Casca do caule	-	Giral e Aguilar, 1953 <i>apud</i> Lima, 2009.
27.	23,24-Diidrocucurbitacina F	Frutos	EtOH (80%)	Olmedo et al., 2007.
28.	23,24-Diidro-25-acetilcucurbitacina F	Frutos	EtOH (80%)	Olmedo et al., 2007.
		Raízes	EtOH (90%)	Lima, 2009
29.	2-O-β-D-Glicopiranosil-23,24-diidrocucurbitacina F	Frutos	EtOH (80%)	Olmedo et al., 2007.
30.	2β,3α-Diidroxi-11,16-dioxo-octanorcucurbit-5-eno	Raízes	EtOH (90%)	Lima, 2009.
31.	Sitosterol	Raízes	EtOH (90%)	Lima, 2009.
32.	Stigmasterol	Raízes	EtOH (90%)	Lima, 2009.
33.	Sitostenona	Raízes	EtOH (90%)	Lima, 2009.
34.	2β,3α-Diidroxi-11-oxo-5-roseno	Raízes	EtOH (90%)	Lima, 2009.

Fonte: O autor (2021).

Figura 8. Estruturas dos compostos relatados na espécie *Coutarea hexandra*.

		11: R ₁ , R ₂ , R ₅ , R ₆ = OH; R ₃ , R ₄ , R ₇ = H
		12: R ₁ = O-β-D-Glc; R ₂ , R ₅ , R ₆ = OH; R ₃ , R ₄ , R ₇
		13: R ₁ = O-β-D-Glc; R ₂ = OMe; R ₅ , R ₆ = OH; R ₃ , R ₄ , R ₇ = H
		14: R ₁ = O-β-D-Ap-(1→6)-β-Glc; R ₂ = OMe; R ₅ , R ₆ = OH; R ₃ , R ₄ , R ₇ = H
		15: R ₁ = O-β-D-Xil-(1→6)-β-Glc; R ₂ , R ₅ , R ₆ = OH; R ₃ , R ₄ , R ₇ = H
1: R ₁ , R ₂ = OMe; R ₃ , R ₄ , R ₇ = H; R ₅ , R ₆ = OH		16: R ₁ = OMe; R ₂ , R ₅ , R ₆ = OH; R ₃ , R ₄ , R ₇ = H
2: R ₁ , R ₂ , R ₆ = OMe; R ₅ = OH; R ₃ , R ₄ , R ₇ = H		17: R ₁ , R ₂ , R ₅ , R ₆ = OMe; R ₃ = OH; R ₄ , R ₇ = H
3: R ₁ , R ₂ = OMe; R ₃ , R ₄ , R ₅ , R ₇ = H R ₆ = OH		18: R ₁ , R ₂ = OMe; R ₃ , R ₅ , R ₆ = OH; R ₄ , R ₇ = H
4: R ₁ , R ₂ , R ₆ = OMe; R ₃ , R ₄ , R ₅ , R ₇ = H		19: R ₁ , R ₂ , R ₆ = OMe; R ₃ , R ₅ = OH; R ₄ , R ₇ = H
5: R ₁ , R ₄ , R ₇ = OH; R ₂ = OMe, R ₃ , R ₅ , R ₆ = H		20: R ₁ , R ₂ , R ₃ , R ₆ = OMe; R ₅ = OH; R ₄ , R ₇ = H
6: R ₁ , R ₂ = OMe; R ₃ , R ₄ , R ₇ = H; R ₅ , R ₆ = OCH ₂ O		21: R ₁ = O-β-D-Glc; R ₂ = OMe; R ₃ , R ₄ , R ₅ , R ₇ = H; R ₆ = OH
7: R ₁ , R ₂ , R ₆ = OMe, R ₃ = OH; R ₄ , R ₅ , R ₇ = H		22: R ₁ = O-β-D-Gal; R ₂ = OMe; R ₃ , R ₄ , R ₅ , R ₇ = H; R ₆ = OH
8: R ₁ , R ₂ , R ₃ , R ₆ = OMe; R ₄ , R ₅ , R ₇ = H		23: R ₁ , R ₂ , R ₃ = OMe; R ₄ , R ₇ = H; R ₅ , R ₆ = OH
9: R ₁ , R ₅ , R ₆ = OH; R ₂ = OMe; R ₃ , R ₄ , R ₇ = H		24: R ₁ , R ₂ , R ₆ = OMe; R ₃ , R ₄ , R ₇ = H; R ₅ = OH
10: R ₁ , R ₂ , R ₄ , R ₇ = OAc; R ₃ , R ₅ , R ₆ = H		25: R ₁ , R ₆ = OH; R ₂ = OMe; R ₃ , R ₄ , R ₅ , R ₇ = H

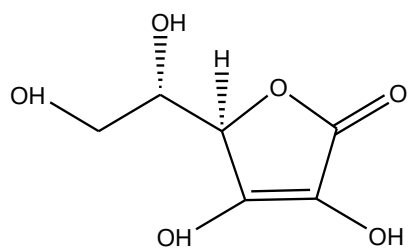
Continuação.



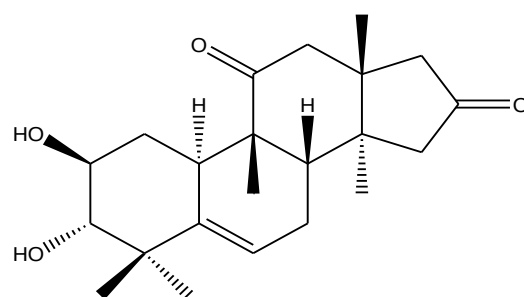
27: $R_1 = R_2 = \text{OH}$

28: $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OAc}$

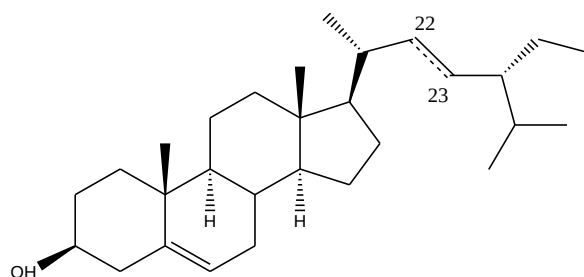
29: $R_1 = \text{O-}\beta\text{-D-Glc}, R_2 = \text{OH}$



26

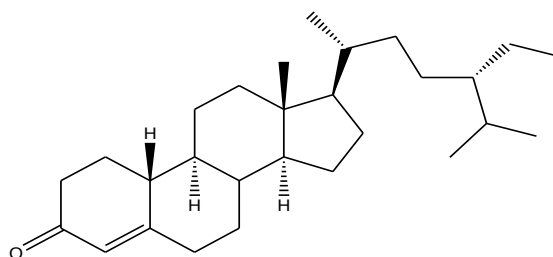


30

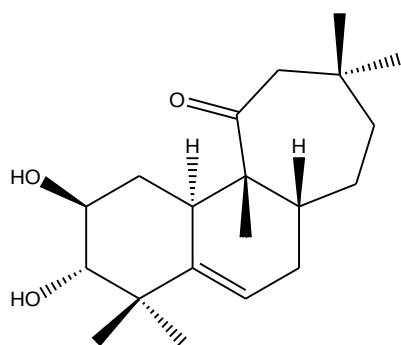


31: 22, 23 diidro

32: $\Delta^{22,23}$



33



34

Dentre os compostos relatados, alguns foram avaliados quanto seu potencial biológico. É o caso das substâncias **4**, **24**, **25** e **28** avaliadas quanto a atividade anti-inflamatória cutânea frente a aplicação tópica do óleo de cróton (0,6 mg/orelha) em camundongos, onde verificou-se uma inibição do edema, de 35,0%; 19,0 %; 67,0 % e 30,0%, respectivamente. As substâncias **23** e **25** foram avaliadas em relação a atividade antioxidante frente ao DPPH, obtendo-se $20,85 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$ e $43,70 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$, valores de CI_{50} comparáveis aos do ácido ascórbico e ácido gálico, respectivamente. O diterpeno **34** foi avaliado quanto a sua atividade anticolinesterásica, em ensaios preliminares, onde houve a inibição da enzima, obtendo-se um resultado positivo, apesar disso, ainda se faz necessário ensaios quantitativos para a confirmação dessa atividade (Lima, 2009).

Araújo et al. (1988), avaliou a substância **10** quanto ao seu potencial antimicrobiano e obteve, na concentração de $25 \mu\text{g/mL}$, ação efetiva contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bordetella bronchiseptica*, os fungos *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis* e contra a levedura *Cryptococcus neoformans*. Enquanto que, na concentração de $12,5 \mu\text{g/mL}$, causou uma inibição completa contra a bactéria *S. epidermidis*.

A atividade citotóxica também foi avaliada para as substâncias **21**, **22**, **27**, **28** e **29** contra as linhas de células humanas cancerígenas MCF-7, H-460 e SF-268 *in vitro*. Foi observado apenas um efeito moderado para a substância **27**: GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) 1,9 MCF-7; 2,6 H-460; 3,7 SF-268 e **29**: GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) 6,3 MCF-7; 8,7 H-460 (OLMEDO, et al., 2007).

2.2.4 Família Annonaceae

Annonaceae representa uma grande família pantropical de árvores e lianas (COUVREUR et al., 2011). É a maior família da ordem Magnoliales com 112 gêneros e 2.440 espécies, dos quais 29 gêneros e 385 espécies ocorrem no Brasil, com considerável riqueza de espécies principalmente nas florestas Amazônica e Atlântica (LOBÃO, 2016). Com base na morfologia e habitat, as espécies são homogêneas em termos de fonte de frutas e óleos comestíveis, e muitas das espécies são utilizadas na medicina popular para tratar vários tipos de tumores e cânceres. Alguns óleos de sementes de certas plantas são usados na produção de sabão, as flores de algumas espécies são utilizadas na perfumaria e por estas razões, a família apresenta importância econômica (BIBA et al., 2014).

2.2.5 Gênero *Annona*

Esse gênero compreende cerca de 162 espécies de árvores e arbustos, 60 destas espécies podem ser encontradas nas florestas brasileiras. É considerado o gênero mais importante da família (DA SILVA ALMEIDA et al., 2014). Isso, pelo fato de as plantas serem largamente utilizadas na medicina popular devido a ampla gama de propriedades medicinais. Quanto a composição química, esse gênero é caracterizado pela bioprodução de esteroides, flavonoides, peptídeos, diterpenos, alcaloides e acetogeninas (PAES et al., 2016).

2.2.6 Espécie *Annona rugulosa*

Annona rugulosa (FIGURA 9) é uma espécie encontrada na Mata Atlântica, que pode chegar a 12m de altura e 40cm de diâmetro. Possui vários nomes populares, que variam como “araticum-de-porco”, “araticum-verde”, “araticum-de-comer”, “araticum” e “anona” (VENDRAMIN et al., 2013). Esta espécie pode ser encontrada na literatura também pela sinonímia botânica *Rollinia rugulosa*. É considerada uma planta arbórea nativa, empregada na medicina popular como diurético, anti-infeccioso e a infusão das folhas no tratamento de dores renais e infecções de garganta (DUARTE; OLIVEIRA; SOUZA, 2016; DICKEL; RATES; RITTER, 2007 *apud* BRUGINSKI, 2016).

Figura 9. *Annona Rugulosa* (Schltdl.) H.Rainer.



Fonte: Rolim e Reis (2016).

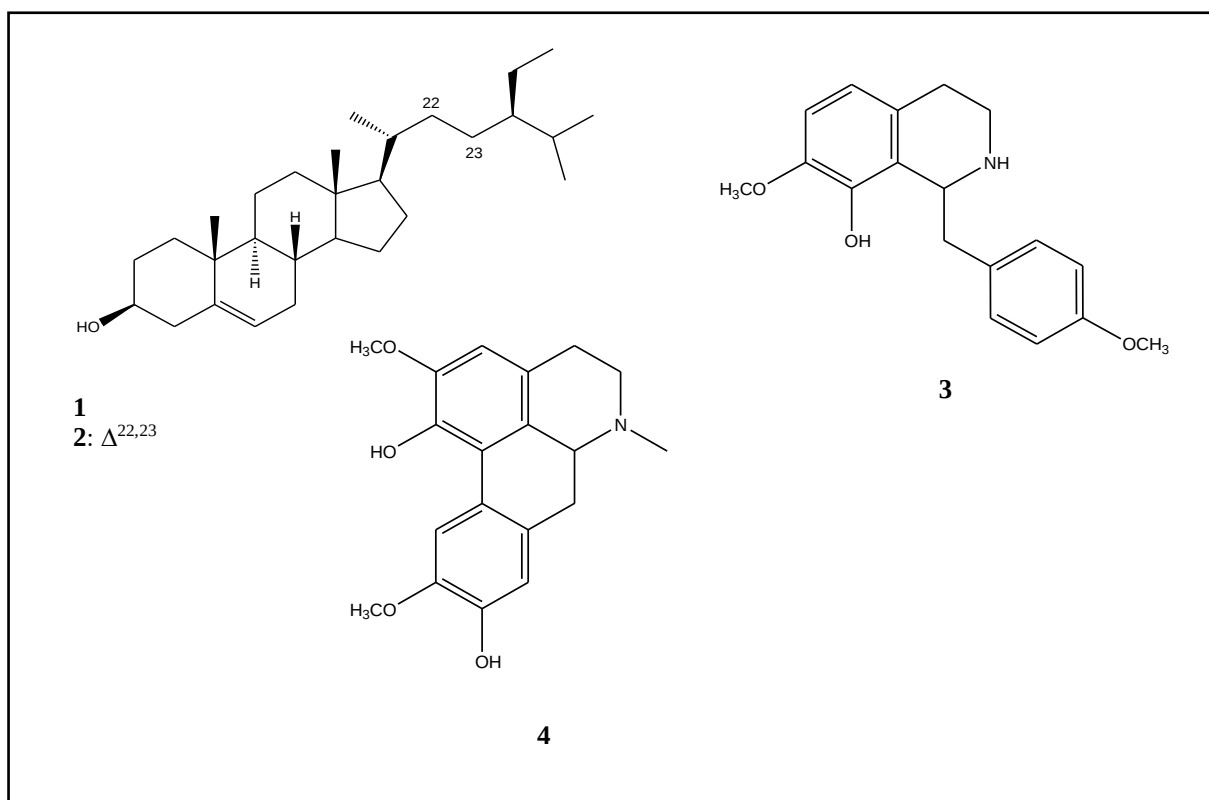
O extrato etanólico das folhas desta espécie mostrou significativa atividade antiproliferativa sobre células HeLa, este resultado pode estar relacionado a sinergia de ação entre os alcaloides e outros metabólitos presentes no extrato. Além disso, sugere-se que este

extrato possa ser utilizado como adjuvante no tratamento de câncer cervical, pois o mesmo foi capaz de potencializar a ação citotóxica do alcaloide vincristina (PAULA, 2019).

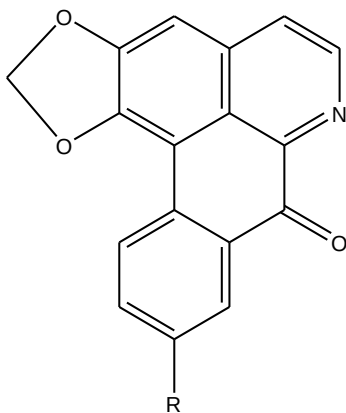
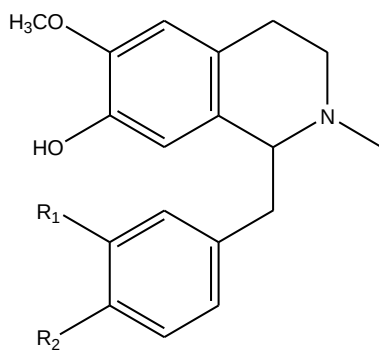
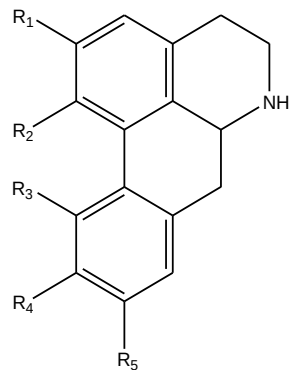
A partir do extrato hidroalcoólico (EtOH/H₂O 70:30 v/v) das folhas, Vendramin et al., (2013) isolou 15 substâncias, sendo elas identificadas como, esteroides: sitosterol (**1**) e estigmasterol (**2**); alcaloides aporfínicos: anonaína (**7**), nornantenina (**8**), *N*-nornuciferina (**9**), xilopina (**10**), norisocordina (**11**), litseferina (**12**), asimilobina (**13**) e isoboldina (**4**); alcaloides oxoaporfínicos: lanuginosina (**5**) e liriodenina (**6**); alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos: magnococlina (**3**), reticulina (**14**) e *N*-metilcoclaurina (**15**). As estruturas desses compostos podem ser verificadas na Figura 10.

Todos esses alcaloides citados acima, foram identificados por Paula (2019) no extrato hidroalcoólico das folhas utilizando LC – MS/MS e por Bruginski (2016) no extrato metanólico das folhas (EMF) utilizando infusão direta ESI (+) – HRMS, além disso, identificaram-se os alcaloides **3**, **4**, **7**, **11**, **13** e **15** no extrato metanólico das sementes (EMS). O mesmo autor, também identificou para os extratos EMF e EMS seis e oito acetogeninas, respectivamente. Mas, devido a essa classe de substâncias apresentar muitos isômeros, a identificação foi apenas parcial, para uma comprovação inequívoca das estruturas necessitaria da utilização de outras técnicas.

Figura 10. Estruturas dos compostos relatados na espécie *Annona rugulosa*.



Continuação

**5:** R = OMe**6:** R = H**14:** R₁ = OH, R₂ = OMe**15:** R₁ = H, R₂ = OH**7:** R₁, R₂ = OCH₂O; R₃, R₄, R₅ = H**8:** R₁, R₂ = OMe; R₃ = H; R₄, R₅ = OCH₂O**9:** R₁, R₂ = OMe; R₃, R₄, R₅ = H**10:** R₁, R₂ = OCH₂O; R₃, R₄ = H; R₅ = OMe**11:** R₁, R₂, R₄ = OMe, R₃ = OH; R₅ = H**12:** R₁, R₂ = OCH₂O; R₃ = H; R₄ = OH; R₅ = OMe**13:** R₁ = OH; R₂ = OMe; R₃, R₄, R₅ = H

Fonte: O autor (2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar qualitativamente a presença de metabólitos secundários, quantificar o potencial antioxidante, teor de flavonoides totais e toxicidade das espécies *Coutarea hexandra* (Rubiaceae) e *Annona rugulosa* (Annonaceae) a fim de contribuir com o conhecimento químico-biológico das mesmas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Coletar o material vegetal das espécies *C. hexandra* e *A. rugulosa*;
- ✓ Registrar as exsicatas de *C. hexandra* e *A. rugulosa*, no herbário da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr);
- ✓ Obter extratos etanólicos das folhas e caules;
- ✓ Executar testes fitoquímicos para diferentes classes de metabólitos secundários;
- ✓ Realizar extração ácido-base dos extratos etanólicos dos caules de *C. hexandra* e *A. rugulosa*;
- ✓ Realizar Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos extratos e frações de *C. hexandra* e *A. rugulosa*;
- ✓ Realizar Cromatografia Preparativa (CP) - gel de sílica;
- ✓ Realizar Cromatografia em Coluna (CC) de gel de sílica;
- ✓ Determinar os teores de flavonoides totais;
- ✓ Identificar o potencial antioxidante do EEFQ frente ao radical livre DPPH•;
- ✓ Analisar a toxicidade das espécies frente à *Artemia salina*.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DA PESQUISA

A pesquisa realizada é classificada como explicativa, isso, pois nas ciências naturais se utiliza muitos métodos experimentais como forma de identificação dos fatores que afetam ou contribuem para ocorrência dos fenômenos. Além disso, explica de forma empírica o motivo desses fenômenos, aproximando o conhecimento da realidade (Gil, 2017).

4.2 COLETA DAS ESPÉCIES

As folhas e os caules das espécies *C. hexandra* (quina-quina) e *A. rugulosa* (anona) foram coletadas nos arredores de Carnaubeiras, um povoado do município de Araiões – MA, com as seguintes coordenadas: 2°52'19,50384''S; 41°59'55,83084''W (*C. hexandra*) e 2°52'18,31404''S; 41°59'47,14476''W (*A. rugulosa*). Após a coleta, uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPa) para identificação das espécies.

4.3 PROCEDIMENTO DA PESQUISA

4.3.1 Preparação dos extratos

As folhas e caules de *C. hexandra* e *A. rugulosa* foram separados, secos em estufa a 40°C, triturados e submetidos à extração com etanol à temperatura ambiente, obtendo-se o extrato etanólico das folhas e caules de *C. hexandra* (EEFQ e EECQ) e *A. rugulosa* (EEFA e EECA). Após a extração, o solvente orgânico foi removido com auxílio de um rotoevaporador modelo 801 da FISATOM, no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI) – *Campus* Parnaíba, e o rendimento dos extratos calculados segundo a Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato} / \text{massa do material vegetal seco}) \times 100 \quad \text{Eq.1}$$

4.3.2 Cromatografia em Camada Delgada

Alíquotas dos EEFAQ, EECQ, EEFA e EECA foram dissolvidos em metanol e submetidos à Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com cromatoplasas da Macherey – Nagel (MN). Os eluentes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1); hexano/AcOEt (8:2) e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5) foram utilizados como fase móvel. Após a eluição, as cromatoplasas foram reveladas em luz UV (λ 254 e 365 nm) para observação de fluorescência e sulfato cérico $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ seguida de aquecimento para observação de manchas coloridas.

4.3.3 Testes fitoquímicos para metabólitos secundários

Os testes fitoquímicos foram executados segundo a metodologia de Matos (2009).

4.3.3.1 Preparo das soluções

Para cada extrato (EEFAQ, EECQ, EEFA e EECA), foram dissolvidos 500 mg em 50 mL de EtOH/ H_2O (8:2). A partir dessa solução mãe hidroalcoólica de cada extrato, os testes foram realizados individualmente, conforme descrito a seguir.

4.3.3.2 Testes para fenóis e taninos

Em um tubo de ensaio contendo 3 mL da solução hidroalcoólica do extrato, foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 , após agitação, observou-se a possível alteração na coloração da solução. Uma variação de cor entre o azul e vermelho é indicativo da presença de fenóis, quando o teste branco for negativo. A formação de um precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (hidrolisáveis) e verde, a presença de taninos flobatênicos (condensados ou catéquicos).

4.3.3.3 Testes para antocianinas, antocianidinas e flavonoides

O teste foi realizado em três tubos de ensaio contendo 3 mL da solução hidroalcoólica, com controle do pH da solução. Em um tubo de ensaio, a solução foi acidificada com HCl (1 mol.L⁻¹) a pH 3, no outro, alcalinizada com NaOH (10%) a pH 8,5 e no terceiro, a solução foi

alcalinizada com NaOH (10%) a pH 11. Uma coloração vermelha em meio ácido, indica a presença de antocianinas e antocianidinas ou de chalconas e auronas. Uma coloração lilás em meio alcalino a pH 8,5, indica a presença de antocianinas e antocianidinas. Uma coloração azul-púrpura em meio alcalino a pH 11, indica a presença de antocianinas e antocianidinas. Neste meio, uma coloração amarela, indica a presença de flavonas, flavonóis e xantonas. A pH 11, uma coloração vermelho-púrpura, indica a presença de chalconas e auronas, enquanto a coloração vermelho-laranja, indica a presença de flavonóis.

4.3.3.4 Testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas

Adicionaram-se 3 mL da solução hidroalcoólica em dois tubos de ensaio, o primeiro foi acidificado com HCl (1 mol.L⁻¹) até pH 1-3, e o segundo foi alcalinizado com NaOH até pH 11. Os tubos foram aquecidos em banho-maria durante 2-3 minutos. O aparecimento ou intensificação da cor indica a presença de constituintes especificados: Em meio ácido, a cor vermelha indica a presença de leucoantocianidinas, a cor pardo-amarelada indica a presença de catequinas (taninos catéquicos); em meio alcalino, a cor vermelho-laranja indica a presença de flavanonas.

4.3.3.5 Teste para flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas

Em um tubo de ensaio contendo 3 mL da solução hidroalcoólica, foram adicionadas uma fita de magnésio e 0,5 mL de HCl concentrado. Após o término da reação, indicado pelo fim da efervescência, observou-se a coloração resultante. O aparecimento ou intensificação da coloração vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonois e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

4.3.3.6 Teste confirmatório para leucoantocianidinas

3 mL da solução hidroalcoólica foram colocadas em banho-maria até a completa evaporação do solvente, em seguida, foram adicionadas 5 mL de álcool etílico e 3 gotas de HCl concentrado, o material foi transferido para um tubo de ensaio e aquecido em banho-maria até a ebulição. Observou-se o possível desenvolvimento de coloração na amostra aquecida.

4.3.3.7 Teste confirmatório para diidroflavonois – Ensaio de Pacheco

5 mL da solução hidroalcóolica foram seca em banho-maria. Alguns cristais de acetato de sódio foram adicionados ao resíduo seco, seguido de 0,5 mL de anidrido acético e 0,5 mL de HCl concentrado. Após a adição dos reagentes, foi observado o possível desenvolvimento de coloração.

4.3.3.8 Teste para quinonas

Pesaram-se 10 mg do extrato hidroalcóolico e transferiu-se para um tubo de ensaio e acrescentaram-se 2 mL de metanol para dissolução. Em seguida, foram adicionadas 5 mL de clorofórmio com agitação. Após 15 min em repouso, foi acrescentado 1 mL de NaOH 5% e observou-se a formação de duas fases. A coloração vermelha na fase aquosa, é indicativo da presença de quinonas.

4.3.3.9 Teste para esteroides e triterpenos – (Lieberman-Burchard)

Adicionaram-se 10 mL do extrato hidroalcóolico do extrato em um béquer, em seguida, o mesmo foi seco em banho-maria a 60°C, o resíduo seco foi extraído com 2 mL de clorofórmio. A solução clorofórmica foi filtrada, em seguida adicionados alguns cristais de Na₂SO₄ anidro e 1 mL de anidrido acético, e agitou-se cuidadosamente. Após agitação, foram adicionadas três gotas de HCl concentrado, em seguida, agitou-se suavemente e observou-se o desenvolvimento de cores. A coloração azul seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteroides livres. A coloração parda até vermelha é indicativa de triterpenóides pentacíclicos livres.

4.3.3.10 Teste para heterosídeos saponínicos

O resíduo insolúvel em clorofórmio (item anterior) foi redissolvido com 10 mL de água destilada. A solução foi filtrada e colocada em um tubo de ensaio, após agitação vigorosa, durante 3 minutos, observou-se a formação de espuma. A espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas (heterosídeos saponínicos).

4.3.3.11 Teste para alcaloides

20 mL da solução hidroalcoólica foram secas em banho-maria a 70°C. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de álcool etílico e acrescido de 20 mL de ácido clorídrico a 0,1 mol.L⁻¹, 1 mL dessa solução dissolvida com HCl foi transferida para um tubo de ensaio, seguida da adição de 2 gotas do reagente de Dragendorff (tetraiodetobismuto de potássio), uma possível formação de precipitado ou turvação das amostras foi observada.

4.3.3.12 Teste para alcaloides e cumarinas

Estes testes seguiram a metodologia adaptada de Kloss et al., (2016). Primeiramente, para o ensaio de alcaloides, preparou-se o reagente de Wagner, dissolvendo-se 2 g de Iodo ressublimado e 6 g de Iodeto de Potássio em 100 mL de água destilada.

Para realizar o ensaio, utilizaram-se 2 mL da solução hidroalcoólica acrescidos de 2 mL de ácido clorídrico (10%), e posterior aquecimento durante 10 minutos. Após o resfriamento, o extrato foi dividido em dois tubos de ensaios e colocaram-se oito gotas, utilizando pipeta de Pasteur, dos seguintes reativos: Tubo 1 - Reativo de Dragendorff: observou-se a possível formação de precipitado de coloração laranja a vermelho; Tubo 2 - Reativo de Wagner: observou-se a possível formação de precipitado de coloração alaranjada.

Para o ensaio de detecção de cumarinas, em um béquer adicionaram-se 2 mL da solução hidroalcoólica, vedou-se o béquer com papel de filtro impregnado em solução de NaOH 10% e aqueceu-se em banho maria a 100°C por 10 minutos. Removeu-se o papel-filtro e examinou-se sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. A fluorescência amarela ou verde indica a presença de cumarinas.

4.3.4 Extração ácido-base e isolamento

4.3.4.1 Extração ácido base

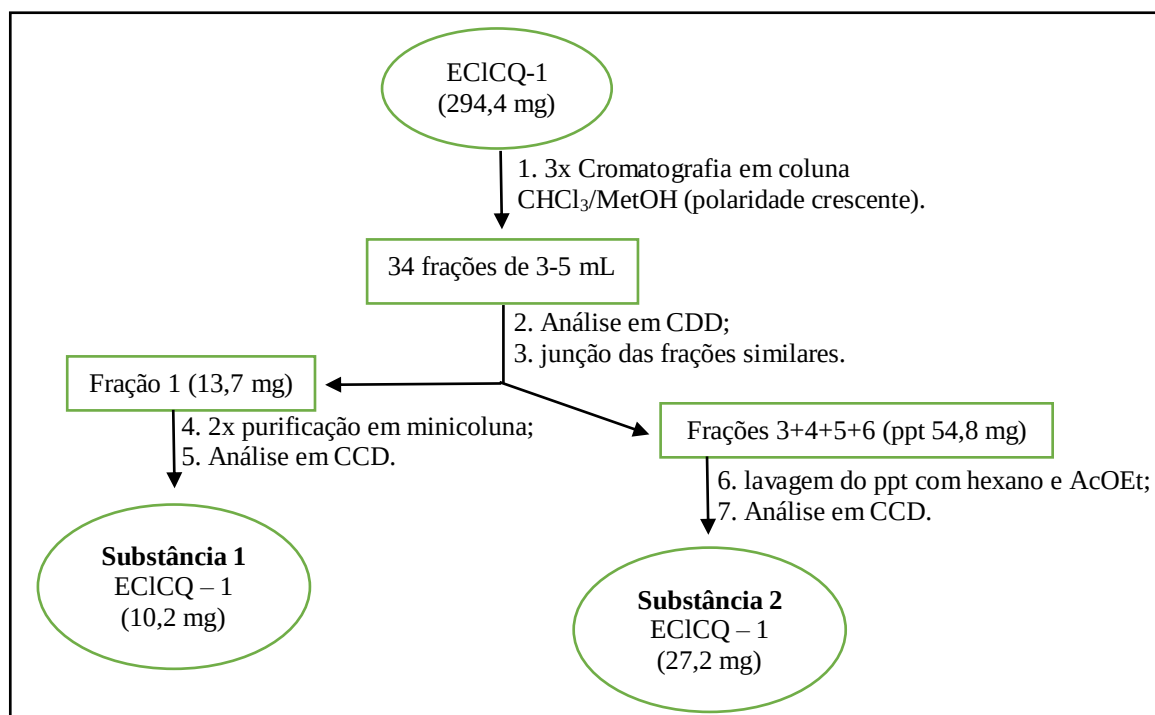
Os extratos EECQ (6,0105 g) e EECA (5,0164 g) foram diluídos em HCl 0,1% e adicionado ao funil de separação. Adicionou-se em seguida clorofórmio para separação das duas fases. Após três lavagens, a fase orgânica foi reservada e a fase aquosa alcalinizada com NaOH 10% até atingir pH entre 10 e 11, na sequência colocou-se novamente no funil de separação, onde ocorreu a 2ª adição de clorofórmio. Após três lavagens, a fase aquosa foi acondicionada na geladeira. Adicionou-se dessecante às fases orgânicas para remover qualquer resquício de água. Após filtração do sólido, o clorofórmio foi evaporado sob pressão em

rotoevaporador (CAVALHEIRO, 2017). Com isso, obteve-se os extratos clorofórmicos das duas fases orgânicas, sendo a 2ª rica em alcaloides, denominados para *C. hexandra* e *A. rugulosa* ECICQ-1 (294,4 mg), ECICQ-2 (67,3 mg), ECICA-1 (83 mg) e ECICA-2 (17,5 mg), respectivamente. Logo após, ambos os extratos foram submetidos a uma CCD analítica com revelação em UV 365 nm, reagente de Dragendorff e sulfato cérico para uma análise preliminar.

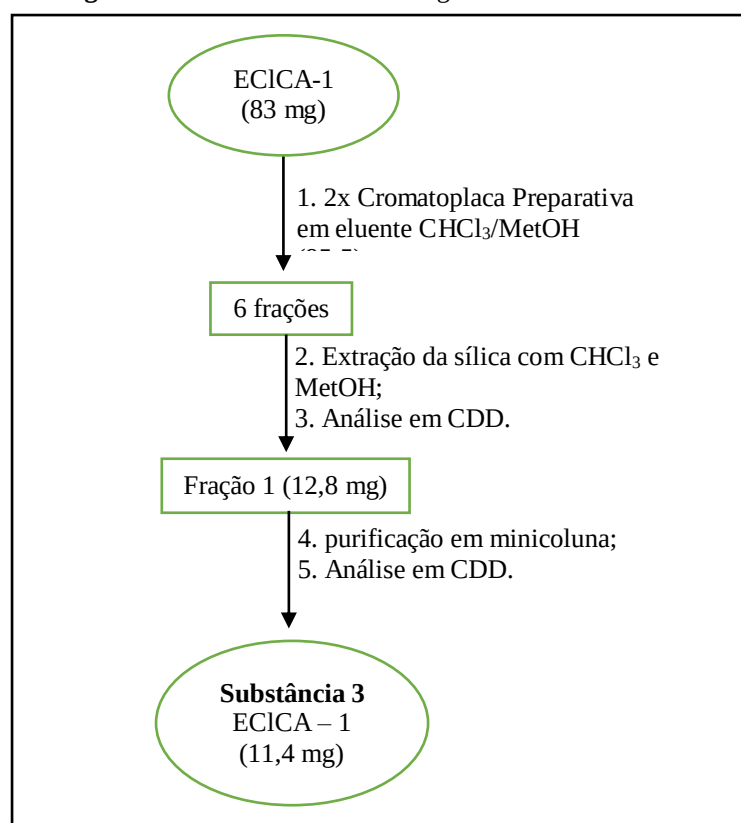
4.3.4.2 Isolamento das substâncias dos extratos clorofórmicos

Na realização do isolamento, foram utilizados os métodos de cromatografia em coluna (CC) e cromatoplaça preparativa (CP) apenas para os ECICQ-1 e ECICA-1 devido apresentarem massa mais significativa. Os extratos foram solubilizados em $\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$ (8:2). Na CC de gel de sílica, o ECICQ-1 foi aplicado seguido da adição $\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$ em polaridade crescente a fim de separar as frações. No método de CP-gel de sílica aplicado ao ECICA-1, o eluente foi preparado na proporção de 95:5 de $\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$. No decorrer dos processos de separação e purificação das amostras, foi utilizada a CCD analítica para verificar a pureza dos compostos supostamente isolados. Com isso, verifica-se nas Figuras 11 e 12 as etapas de fracionamento pelos quais as amostras foram submetidas:

Figura 11. Fracionamento cromatográfico do ECICQ-1.



Fonte: O autor (2021).

Figura 12. Fracionamento cromatográfico do EClCA-1.

Fonte: O autor (2021).

4.3.5 Avaliação do teor de flavonoides

O teor de flavonoides totais (FLAT) dos extratos das folhas e caules das espécies *C. hexandra* e *A. rugulosa* foi determinado por espectrofotometria de absorção molecular utilizando-se uma solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3), segundo a metodologia de Pozzi (2007) com modificações.

4.3.5.1 Construção da curva de calibração

Foi preparada uma solução padrão de rutina a 1000 mg.L^{-1} , dissolvendo-se 0,1 g de rutina em 100 mL de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:3). As diluições para a construção da curva de calibração foram preparadas nas concentrações de 2,5-20 mg.L^{-1} (2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20 mg.L^{-1}). A solução metanólica padrão de AlCl_3 foi preparada dissolvendo-se 1 g em 50 mL de MeOH .

4.3.5.2 Determinação de flavonoides totais

Inicialmente, para cada extrato, a solução mãe foi preparada dissolvendo-se 10 mg do extrato etanólico em 10 mL de MetOH, obtendo-se a concentração de 1000 µg/mL. Transferiu-se uma alíquota de 500 µL desta solução para balões de 10 mL e acrescido de 1 mL do reagente de cloreto de alumínio (50 mg.mL⁻¹). Finalmente a solução teve seu volume acertado para 10 mL metanol. Os testes foram feitos em triplicata e com o branco (solução mãe e metanol) em paralelo. Após 30 minutos, a absorbância das amostras foi medida a 420 nm em espectrofotômetro. O teor de flavonoides totais (FLAT) foi determinado usando a curva analítica de rutina na faixa de 2,5-20 mg. L⁻¹, os valores foram expressos em miligramas de equivalente de rutina por grama de extrato (mg de ER/g de extrato), a partir da Equação 3.

$$A = 0,0342 C - 0,0263 \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

A = absorbância;

C = concentração, com coeficiente de correlação linear R = 0,9948.

4.3.6 Atividades biológicas

4.3.6.1 Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH•)

A capacidade antioxidante do extrato EEFAQ foi determinada pelo ensaio do radical livre DPPH•, em que é observado o consumo desse radical pela amostra testada em diferentes concentrações através da medida do decréscimo da absorbância. Estas medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 516 nm. A rutina e o hidroxitolueno butilado (BHT), foram utilizados como controle positivo. A equação da curva de calibração do DPPH• utilizada foi $C = 35,846A - 0,230$, onde C corresponde à concentração de DPPH• no meio, A é a absorbância medida no comprimento de onda de 516 nm e o coeficiente de correlação R = 0,9997 (SOUSA et al., 2007).

4.3.6.1.1 Leitura das medidas de absorbância das amostras

Preparou-se uma solução estoque do EEFAQ em metanol na concentração de 250 µg/mL. Estas soluções foram diluídas em metanol nas concentrações de 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL. As medidas da absorbância das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra e 2,7 mL da

solução estoque de DPPH•) foram feitas a 516 nm, no 1º, 5º, 10º, 20º e 30 minutos. A mistura de metanol (2,7 mL) e solução metanólica da amostra (0,3 mL) foi utilizada como branco (SOUSA et al., 2007). O valor da absorbância na concentração de 250 µg/mL no tempo de 30 minutos foi convertido em porcentagem de atividade antioxidante (%AA), de acordo com a equação:

$$\%AA = \{ [Abs_{DPPH} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100 \} / Abs_{DPPH} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde Abs_{DPPH} é a absorbância da solução metanólica de DPPH (2,7 mL a 40 µg/mL acrescida de 0,3 mL de MeOH) e $Abs_{amostra}$ é a absorbância da mistura reacional (2,7 mL de DPPH+0,3 mL de amostra). Todas as análises foram realizadas em triplicata (SOUSA et al., 2007).

4.3.6.1.2 Análise estatística

Os valores da média de três repetições ($n=3$) $\pm$ desvio padrão da média e a CE_{50} foram calculados utilizando-se o programa *Microsoft Excel* e *Microsoft Origin 8.0*.

4.3.6.2 Toxicidade frente à *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente à *A. salina* foi realizado conforme McLaughlin et al. (1991). Foram preparadas soluções estoque em metanol na concentração de 10.000 µg/mL dos extratos das folhas e caule das espécies *A. rugulosa* e *C. hexandra* e soluções na concentração de 25.000 µg/mL apenas para a *C. hexandra*. A partir da solução estoque alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio de 30 mL para obtenção de soluções nas concentrações finais de 100, 120, 140, 160, 180 e 200 µg/mL para ambas as espécies e nas concentrações finais de 2,0; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4 e 2,5 mg/mL para a *C. hexandra*. Após completa evaporação do metanol à temperatura ambiente, foram adicionadas em cada tubo 0,1 mL de DMSO e 5 mL de água do mar para solubilização das amostras. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, foram transferidas 10 larvas de *A. salina* e o volume final (10 mL) completado com água do mar. As larvas ficaram expostas às soluções das amostras por 24 horas. Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração da amostra e controle negativo constituído por 0,1 mL de DMSO, 10 mL de água do mar e as larvas. Após 24 horas de exposição, realizou-se a contagem

das larvas vivas e mortas em placas de Petri, sendo consideradas vivas todas aquelas que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observadas próximas a uma fonte luminosa. Só foram considerados válidos os testes nos quais o controle não apresentou mortalidade. Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico em *Microsoft Excel*, utilizando o método PROBITOS, o qual forneceu o valor de DL_{50} (Concentração do extrato que tem 50% de toxicidade).

4.4 TRATAMENTO DOS DADOS

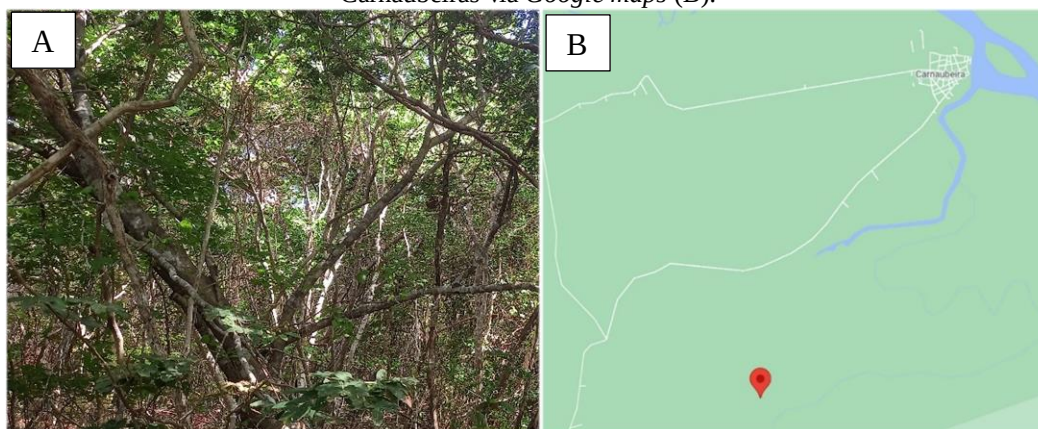
As análises fitoquímicas são baseadas nas observações colorimétricas, formação de precipitado, formação de espuma e absorção de fluorescência no UV, por isso será considerados dados qualitativos. Dessa forma, para aqueles considerados positivos, os dados foram tratados com o símbolo (+), podendo ocorrer sua variação para dois (++) ou três (+++) símbolos, dependendo da intensidade do resultado obtido. O mesmo ocorre para os resultados negativos, tratados com o símbolo (-). Já as atividades farmacológicas foram realizadas em triplicata e tratadas quantitativamente utilizando-se o programa *Microsoft Excel* e *Microsoft Origin 8.0*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COLETA DAS ESPÉCIES

As espécies foram coletadas próximo ao povoado de Carnaubeiras, em Araisos – MA, na região do Delta do Rio Parnaíba (FIGURA 13). Para a confirmação dos nomes científicos, exsicatas das espécies foram depositadas no herbário da Universidade Federal do Delta do Parnaíba sob os números de tombo 6975 (*C. hexandra*) e 6976 (*A. rugulosa*).

Figura 13. Local da coleta (A); local da coleta (ícone vermelho) em relação ao povoado Carnaubeiras via *Google maps* (B).



Fonte: O autor (2022).

Fonte: *Google maps* (2022).

O Delta do Rio Parnaíba é o único do Continente Americano a desaguar diretamente no oceano, compreendendo uma área de cobertura com cerca de 2.750 km², é considerado o terceiro maior do mundo. É uma região caracterizada como fluvio-marinha, bastante dinâmica, formada pela fusão ecológica entre as formações de Cerrado, Caatinga e Sistemas marinhos, situados entre os estados do Piauí e Maranhão. Apesar da influência desses biomas e da grande extensão, pouco se sabe sobre sua biodiversidade, sendo os trabalhos sobre essa temática recentes e bastante escassos (GUZZI, 2012).

5.2 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

As massas dos caules e folhas com os respectivos rendimentos EECQ e EEFAQ (*C. hexandra*) e EECA e EEFA (*A. rugulosa*) estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5. Rendimento dos extratos das espécies estudadas.

	EECQ	EEFQ	EECA	EEFA
Massa do material seco	377,5 g	113,6 g	400,5 g	52,5 g
Massa do extrato etanólico	20,26 g	10,86 g	26,16 g	10,4 g
Rendimento	5,36 %	9,55 %	6,53 %	19,8 %

Fonte: O autor (2022).

A partir da Tabela 5, percebe-se que os rendimentos das folhas são maiores em relação aos dos caules, uma diferença de quase o dobro para a *C. hexandra* e mais que o triplo para a *A. rugulosa*. Essa grande diferença, pode estar relacionada a diversos fatores, Franzen et al. (2018), destacam que a extração pode ser realizada por diferentes processos, métodos, solventes e tempo de extração dependendo da espécie. Quanto a isso, todos esses fatores foram iguais para ambas as plantas e partes da planta, utilizando-se o etanol como solvente de extração, escolhido devido a sua natureza anfifílica, que permite extrair substância de caráter polar e apolar, foram realizadas 4 extrações com 3 dias de duração cada e utilizando-se o banho ultrassom para otimizar a extração. Mas, os autores ainda ressaltam sobre o tamanho das partículas do soluto influenciar no rendimento dos extratos. Com isso, pelo fato de as folhas secas ficarem muito mais frágeis, após a trituração, obteve-se partículas bem pequenas em relação aos caules, que por serem bem mais resistentes, após a trituração, as partículas obtidas foram bem maiores. Isso, confere uma maior superfície de contato soluto-solvente para as folhas, fato que pode ter contribuído para que o rendimento das folhas tenha sido superior.

Outro fator importante a ser considerado, é de que as folhas apresentam uma grande taxa de clorofila. Para Vieira, Bezerra e Dos Santos (2021), a clorofila é indicada pela cor verde brilhante e que pode ser degradada pela temperatura. Mesmo que as folhas tenham sido secas e perdido consideravelmente sua coloração verde brilhante, ou seja, a clorofila, após o processo de extração, percebeu-se que as colorações dos extratos das folhas ainda apresentavam a coloração verde, enquanto os extratos dos caules, coloração marrom escuro. Com isso, a coloração verde nos extratos das folhas pode ser um indicativo da presença de clorofila, que por sua vez, pode ter sido o motivo desses extratos apresentarem um rendimento consideravelmente maior em relação aos extratos dos caules.

Quando se compara com resultados da literatura, para *C. hexandra* percebe-se que o rendimento está dentro da faixa de resultados de outros autores, que quando utilizaram o etanol como solvente extrator, obtiveram rendimentos de 10,05; 13,13 e 29,0 % para o EECQ e 3,73; 13,47 e 54,6 % para o EEFQ (CARVALHO, 2009; LIMA, 2009; NUNES et al., 2012).

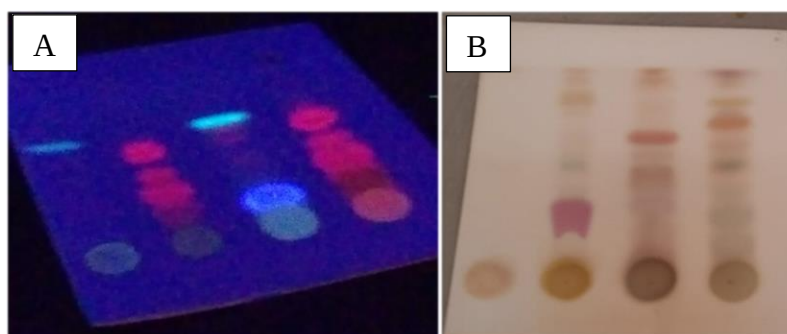
Utilizando metanol como solvente extrator, D'Agostino (1990) obteve-se um rendimento de 1,5% para o EECQ, enquanto Monache (1983), utilizando benzeno a quente obteve 4,5%. Em relação a *A. rugulosa*, não há trabalhos na literatura relacionados ao seu caule, apenas folhas, para as quais Vendramin et al. (2013), obtiveram um rendimento de 18,34 % utilizando etanol e água (7:3). Para os valores diferentes de rendimento utilizando o mesmo tipo de solvente, o fato de a região de coleta ser diferente pode ter sido determinante, segundo Martins (2019), fatores como luminosidade, temperatura, pluviosidade, sazonalidade, radiação ultravioleta, composição atmosférica, além das interações bióticas interferem de maneira quali e quantitativamente na produção de metabólitos secundários e, por consequência, no rendimento.

5.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Cromatografia é uma técnica onde os constituintes de uma mistura são separados com base nas diferenças de velocidade nas quais são transportados sobre uma fase estacionária por uma fase móvel. Na CCD, a fase estacionária é suportada sobre uma placa plana e a fase móvel desloca-se sobre a fase estacionária por ação da capilaridade (SKOOG et al., 2010). Essa técnica permite uma rápida análise simultânea de diferentes amostras, sendo muito utilizada em análise fitoquímica de material vegetal (SILVEIRA, 2019).

A partir disso, essa técnica foi utilizada para analisar preliminarmente o perfil químico dos extratos. Após a eluição em ambos os eluentes descritos no item 4.3.2, verificou-se que a melhor mistura foi a de hexano/AcOEt (8:2), pois mostrou maior quantidade de fluorescências no UV₃₆₅ e de manchas bem definidas após revelação com Ce(SO₄)₂ (FIGURA 14). Na placa da figura abaixo, os extratos estão aplicados, da esquerda para a direita, na seguinte ordem: EECQ, EEFQ, EECA e EEFA.

Figura 14. CCD revelada em UV₃₆₅ (A) e CCD revelada em Ce(SO₄)₂ (B).



Fonte: O autor (2022).

Como pode-se observar na Figura 14 (A), o EECQ apresentou as fluorescências amarela e verde, o EEFAQ amarela e laranja, o EECA amarelo-esverdeado, azul, laranja e verde claro e o EEFA laranja e amarela, que foi levemente mascarada pelo laranja no ponto de aplicação. Para Soares (2020), a coloração laranja refere-se a flavonoides, enquanto Silva (2021) aborda que, dependendo da estrutura do flavonoide, ele também pode apresentar as fluorescências amarelo, azul ou verde quando irradiado por luz UV em 365 nm, a mesma autora sugere que a fluorescência azul pode ser atribuída às cumarinas. Corroborando com isso, Palencia (2004) afirma que todas as cumarinas apresentam fluorescência azul intensa ou azul-esverdeada em UV₃₆₅.

Quando revelada em Ce(SO₄)₂, o EECQ apresentou uma mancha marrom claro no ponto de aplicação, o EEFAQ manhas amarela no ponto de aplicação, roxa e marrom claro, o EECA e EEFA apresentaram manchas cinza, levemente rosa e marrom claro. Chaves (1997), infere que as manchas cinzas e amarelas referem-se a açúcares e flavonoides respectivamente, enquanto a coloração rósea a substâncias terpênicas. A cor roxa, segundo Tananta (2012) indica a presença de terpenoides.

5.4 TESTES FITOQUÍMICOS PARA METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Nas análises fitoquímicas, pelo fato de os testes serem colorimétricos, alguns resultados foram de difícil interpretação. Dentre os metabólitos verificados para a *C. hexandra*, destacam-se principalmente os taninos flobatênicos, chalconas e auronas, quinonas, heterosídeos saponinínicos e cumarinas, os alcaloides foram observados apenas no caule, enquanto os esteroides livres apenas nas folhas (QUADRO 1). Para a espécie *A. rugulosa*, destacam-se os flavonois, heterosídeos saponínicos e cumarinas, os alcaloides foram identificados apenas no caule, enquanto os esteroides livres, apenas nas folhas (QUADRO 2).

Quadro 1. Classes de constituintes químicos identificados no extrato etanólico das folhas e caules de *Coutarea hexandra*.

METABÓLITOS	EECQ	RESULTADO COLORIMÉTRICO	EEFAQ	RESULTADO COLORIMÉTRICO
Fenóis	-	-	-	-
Taninos pirogálicos	-	-	-	-
Taninos Flobatênicos	+++	Verde escuro	+++	Verde escuro
Catequinas	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	ND	ND	+++	Vermelho alaranjado

Flavanonas	+	Intensificação da cor vermelho alaranjada	++	Intensificação da cor vermelho alaranjada
Flavonois, flavanonas, flavanonois e xantonas	++	Vermelho alaranjado	+++	Vermelho intenso
Antocianinas e antocianidinas	-	-	-	-
Flavonas e xantonas	-	-	-	-
Chalconas e auronas	+++	Vermelho purpura	+++	Vermelho purpura
Flavonois	-	-	-	-
Diidroflavonois	ND	Vermelho escuro	ND	Marrom esverdeado
Quinonas	+++	Vermelho intenso	+++	Vermelho intenso
Esteroides livres	-	-	+++	Transição do azul p/ verde intenso
Triterpenóides pentacíclicos livres	-	-	-	-
Heterosídeos saponínicos	++	Espuma	+++	Espuma
Alcaloides	+++	Ppt vermelho escuro e ppt alaranjado	ND	ND
Cumarinas	+++	Verde fluorescente	+++	Verde fluorescente

Fonte: O autor (2022).

Quadro 2. Classes de constituintes químicos identificados no extrato etanólico das folhas e caules de *Annona rugulosa*.

METABÓLITOS	EECA	RESULTADO COLORIMÉTRICO	EEFA	RESULTADO COLORIMÉTRICO
Fenóis	-	-	-	-
Taninos pirogálicos	-	-	-	-
Taninos Flobatênicos	++	Verde escuro	+	Verde escuro
Catequinas	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	ND	ND	ND	ND
Flavanonas	-	-	-	-
Flavonois, flavanonas, flavanonois e xantonas	+	Levemente avermelhado	-	-
Antocianinas e antocianidinas	-	-	-	-
Flavonas e xantonas	-	-	-	-
Chalconas e auronas	-	-	-	-
Flavonois	++	Vermelho laranja	-	-
Diidroflavonois	ND	Marrom esverdeado	ND	Verde intenso
Quinonas	-	-	-	-
Esteroides livres	-	-	+++	Transição do azul p/ verde intenso
Triterpenoides pentacíclicos livres	-	-	-	-
Heterosídeos saponínicos	+++	Espuma	+	Espuma
Alcaloides	+++	Ppt vermelho escuro e ppt alaranjado	ND	ND
Cumarinas	+	Verde fluorescente	+++	Verde fluorescente

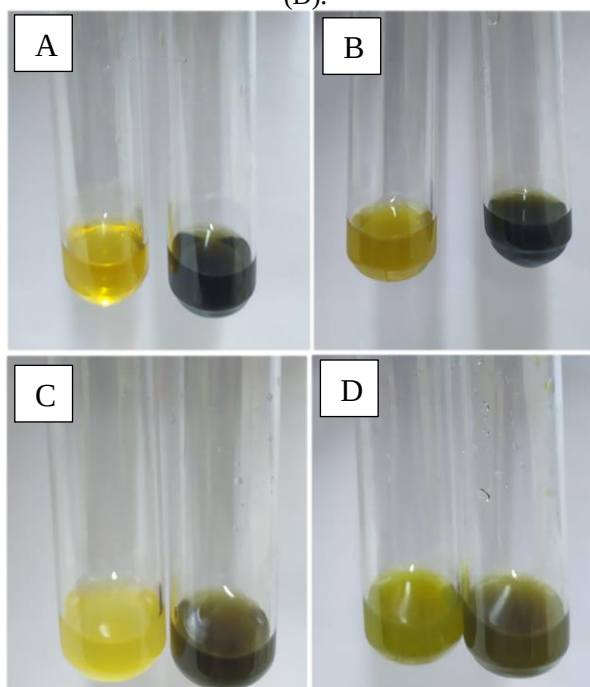
Fonte: O autor (2022).

5.4.1 Taninos

São metabólitos secundários da classe dos compostos fenólicos com importante atividade antimicrobiana encontrados em plantas (PEREIRA et al., 2015). Possuem massa molecular intermediária-alta (500-3000 Da), ricos em grupos fenólicos e são capazes de precipitar ou se ligar às proteínas solúveis em água. Podem ser classificados em dois grupos, os condensados e os hidrolisáveis. Os condensados (proantocianidinas), são formados pela condensação de subunidades de flavan-3-ol (como catequinas, epicatequinas, entre outras), gerando uma rede oligomérica e/ou polimérica. Os hidrolisáveis, são formados a partir do ácido gálico ou pelo seu produto de condensação dimérica (o ácido hexadroxifenílico), onde estão esterificados com um glicosídico, como a glicose (SANTIAGO et al., 2020).

No teste para evidenciar a presença dessa classe de compostos (item 4.3.3.2), foi observado o aparecimento de uma coloração verde escuro após a adição de cloreto férrico na solução dos extratos, evidenciando-se assim, a presença de taninos condensados (ou flobatênicos) nos extratos EECQ, EEFAQ, EECA e EEFA, como mostra a Figura 15 a seguir:

Figura 15. Evidência da presença de taninos flobatênicos nos extratos EECQ (A), EEFAQ (B), EECA (C) e EEFA (D).

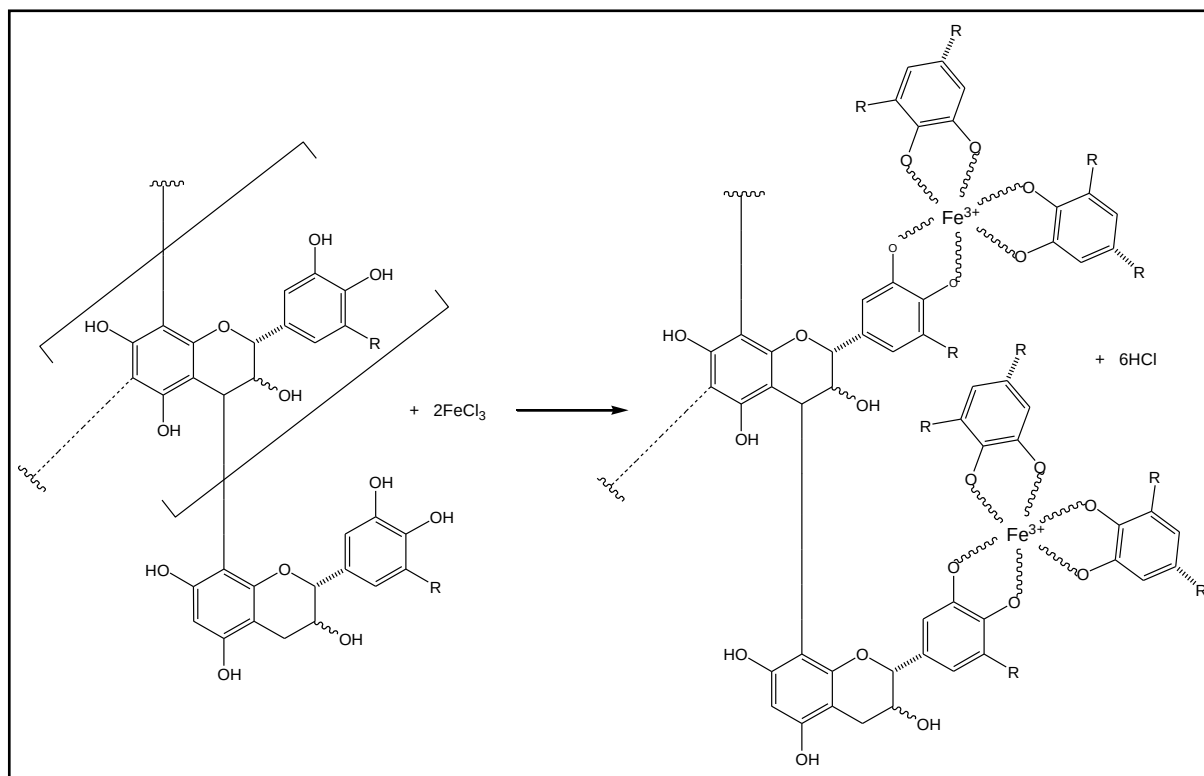


Fonte: O autor (2022).

A mudança de coloração ocorre devido a troca de ligantes cloretos pelos grupos fenólicos dos taninos condensados, formando um complexo que apresenta a coloração verde

escuro. Isso ocorre devido a algumas hidroxilas dos grupos fenólicos se localizarem na posição *orto*, o que favorece a ligação com metais (MARCHINI, 2015). Tal reação pode ser esquematizada, como mostra a Figura 16, considerando a estrutura padrão dessa classe de compostos indicada por Olegário et al., (2019) e a reação de complexação por Wang, Fang e Mallavarapu (2015).

Figura 16. Reação de complexação de taninos por cloreto férrico.



Fonte: Adaptado de Olegário et al., (2019); Wang, Fang e Mallavarapu (2015).

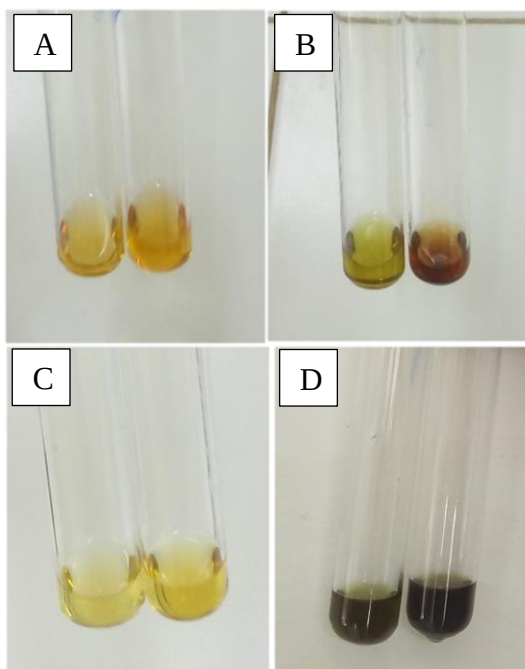
Nas plantas, os taninos condensados estão associados a capacidade de defesa do vegetal contra seus inimigos naturais, nos mecanismos de defesa contra os microorganismos patógenos (COUTO et al., 2021). Tais atividades tóxicas, estão relacionadas as fortes interações dos taninos condensados com proteínas. Ainda, interagem fortemente com íons metálicos e macromoléculas como os polissacarídeos, formam complexos insolúveis com alcaloides, gelatinas e diversas proteínas, tudo isso, implica em uma grande importância biológica dessa classe de compostos (SILVA et al., 2004).

5.4.2 Leucoantocianidinas

Pertencem a classe dos flavonoides, também conhecidas como flavan-3,4-dióis (ou ainda, leucocianidinas), são formadas a partir da redução de diidroflavonois ou flavononas, onde ocorre alterações no padrão das hidroxilas no anel aromático. Após sua formação, essas substâncias dão origem a outros compostos, como as catequinas, proantocianidinas e antocianinas (DEWIK, 2009). No organismo humano, as leucoantocianidinas podem aumentar a tonicidade e resistência das paredes capilares, são aplicadas para o tratamento de várias doenças envolvendo veias e artérias, dentre as quais, pode-se citar a má distribuição do fluxo sanguíneo microcirculatório no cérebro e no coração, fragilidade capilar alterada e permeabilidade relacionada a diabetes mellitus (MENDES, 2019).

No teste confirmatório para leucoantocianidinas (4.3.3.6), a metodologia sugere teste positivo quando ocorre o desenvolvimento de coloração. Ao submeter os extratos à metodologia, foi observado a presença desses metabólitos no EEFQ pelo desenvolvimento de uma coloração vermelha, mas nos EECQ, EECA e EEFA, ocorreu o escurecimento da coloração, desta forma, foram considerados “não definidos” (ND). Isso pode ser evidenciado na Figura 17 abaixo:

Figura 17. Teste confirmatório pra Leucoantocianidinas para EECQ (A), EEFQ (B), EECA (C) e EEFA (D).

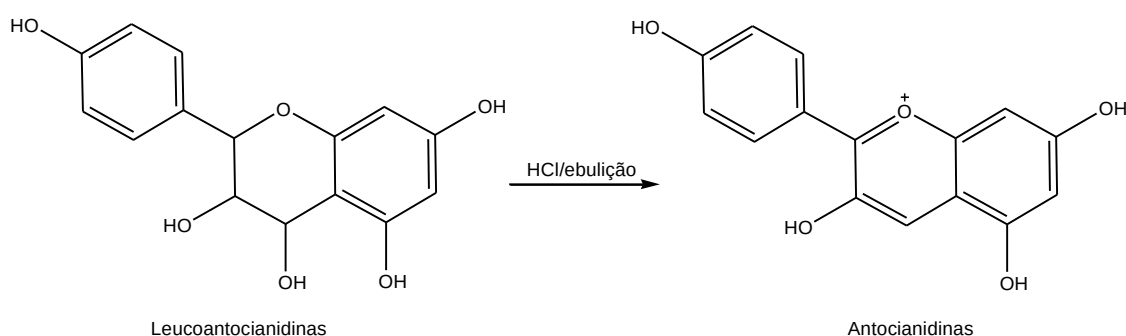


Fonte: O autor (2022).

Como observado, na imagem B, houve o desenvolvimento da coloração vermelha, que segundo Zuanazzi e Montanha (2007), é característica das antocianidinas. Então, neste teste,

houve a conversão das leucoantocianidinas para antocianidinas causando o desenvolvimento da coloração. Na realização do teste, o extrato é submetido a ácido e aquecimento, ambos fatores que podem influenciar a formação das antocianidinas. Para Souza (2019), devido ao meio ácido, as estruturas das leucoantocianidinas desenvolvem a desidrogenação no C-2, com posterior desidratação em C-3 e C-4, a adição de OH em C-3 e, então formando o cátion flavílico (antocianidina) responsável pela coloração vermelha (FIGURA 18).

Figura 18. Formação do cátion flavílico.



Fonte: Adaptado de Zuanazzi e Montanha (2007).

5.4.3 Flavonois, flavanonas, flavanonois e xantonas

Os flavonois, flavanonas e flavanonois pertencem a classe dos flavonoides, mudando apenas o padrão de substituição no esqueleto básico um do outro. Já as xantonas, classificadas como compostos heterocíclicos que contém uma fração *orto*-pirânica condensada com dois anéis benzênicos, sendo denominadas como 9H-xanten-9-ona (IUPAC), apresentam uma estrutura totalmente planar, o que as diferem dos flavonoides, no entanto, ainda podem ser classificadas como tal, mas também, podem ser englobadas em um vasto grupo de compostos (devido a sua porção heterocíclica), tais como as cumarinas, benzopiranos, açúcares, etc. (FERREIRA, 2019 a).

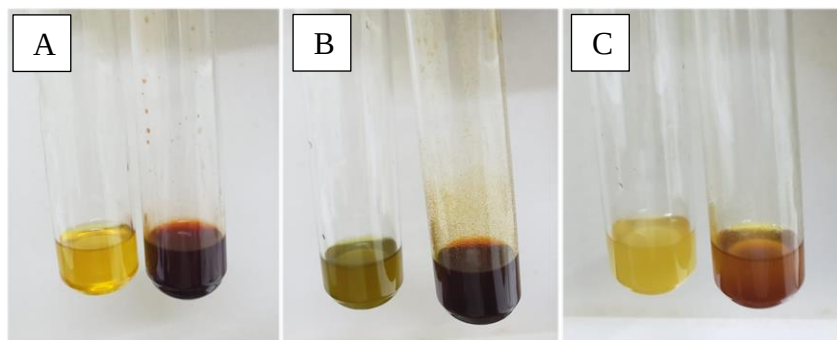
No teste 4.3.3.5, tanto os flavonois, flavanonas, flavanonois e xantonas desenvolvem coloração vermelha quando tratada com magnésio e ácido concentrado. Os extratos EECQ, EEFAQ e EECA desenvolveram a coloração vermelha e laranja indicando a presença de tais constituintes livres ou seus heterosídeos. Tais evidências podem ser observadas na Figura 19.

5.4.5 Chalconas, auronas e flavonóis

Pertencentes a classe dos flavonoides, as Chalconas são quimicamente definidas como cetonas α - β -insaturadas (enonas), com o esqueleto 1,3-diaril-prop-2-em-1-ona, difere dos flavonoides por não possuir o anel pirânico, o qual é formado pela ciclização da hidroxila no C-2' (BITENCOURT et al., 2020). As auronas são derivadas da 2-benzilidenocumaranona, apresenta uma ligação olefínica, o que infere a isomeria geométrica em suas estruturas, sendo a maioria das auronas naturais com a ligação Z-olefina e, assim como as chalconas, são responsáveis pela pigmentação amarela. Os flavonóis são classificados juntos com as flavonas devido as suas análises, síntese e reações químicas possuírem base teórica comum. Sendo derivados da 3-hidroxi-2-fenilcromona, os flavonóis diferem das flavonas apenas pela hidroxila no C-3 (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

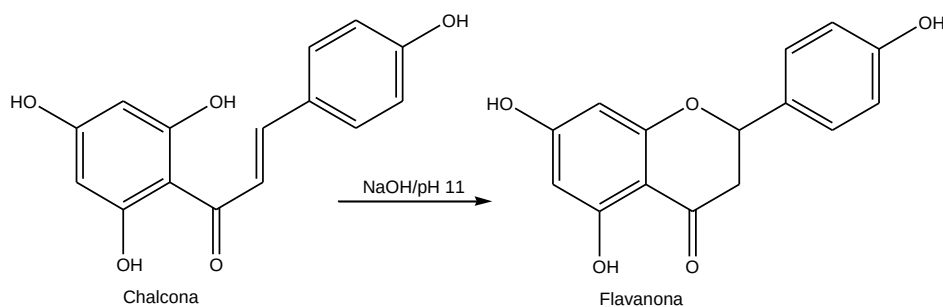
No teste para identificar esses compostos (4.3.3.3), em pH 11 foi observado a presença de chalconas e auronas a partir do aparecimento de uma coloração vermelho púrpura nos extratos EECQ e EEFQ, enquanto os flavonóis foram identificados pelo aparecimento de uma coloração laranja no EECA. Pode-se observar as cores verificadas na Figura 23 abaixo:

Figura 23. Evidência da presença de chalconas e auronas nos EECQ (A) e EEFQ (B) e flavonóis no EECA (C).



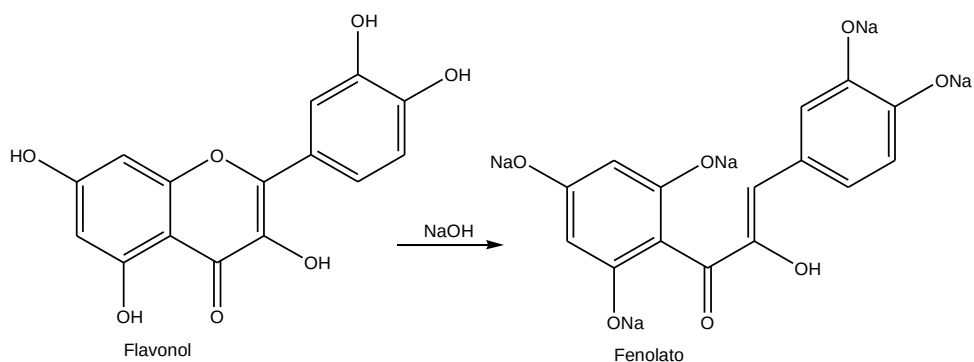
Fonte: O autor (2022).

Tanto as chalconas, quanto as auronas apresentam a característica comum de possuir coloração amarela que em meio alcalino muda para vermelho, como o que foi observado nos extratos EECQ e EEFQ (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). Segundo Vasconcelos (2012), as chalconas, desde que haja uma hidroxila no C-2' ou C-6', ao serem submetidas a pH alcalino se converte em sua forma isomérica flavanona, o que pode ser o indicativo da mudança de coloração evidenciada nesse teste. Com isso, observa-se a seguir a isomerização de uma chalcona em meio básico (FIGURA 24).

Figura 24. Isomerização de uma chalcona em pH básico

Fonte: Adaptado de Vasconcelos (2012).

Segundo Sousa (2019), os flavonóis reagem em condições básicas formando fenolatos, que são corados e solúveis em água, como mostrado no EECA pelo aparecimento da cor laranja. Ainda ressalta que o aparecimento da coloração dependerá das modificações que ocorrerá na molécula, quando a mesma é submetida a diferentes valores de pH, que vai variar de acordo com a estrutura do composto. Uma proposta para a formação de um fenolato a partir de um flavonol (quercetina) pode ser observada na Figura 25.

Figura 25. Formação de um fenolato.

Fonte: Adaptado de Sousa (2019).

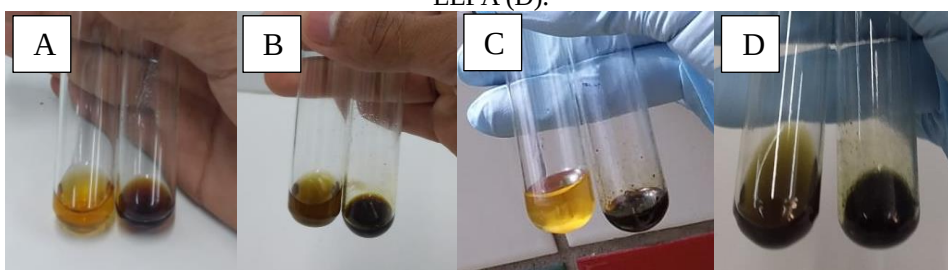
5.4.6 Diidroflavonóis

Também conhecidos como flavanonois ou 3-hidroxi-flavanonas, os diidroflavonóis pertencem a classe dos flavonoides (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). O que os tornam diferentes dos outros flavonoides é a ligação simples entre os carbonos 2 e 3, ou seja, são dihidrogenados. Biossinteticamente, são intermediários auxiliando na produção de chalconas e

flavonóis. Nas plantas, atuam na proteção contra doenças e, por isso, apresentam potencial atividades farmacológicas (BARREIROS, 2005).

No teste confirmatório para diidroflavonóis, foi observado o aparecimento de coloração nos extratos EECQ, EEFAQ, EECA e EEFA como mostra a Figura 26. Apesar da metodologia inferir que a mudança de coloração evidencia a presença desses compostos nos extratos, autores como Machado et al. (2011) e Ocampos (2013), relatam que a presença de diidroflavonóis é confirmada quando ocorre uma mudança de coloração para o roxo. Dessa forma, esse teste foi considerado como não definido (ND).

Figura 26. Ensaio de Pacheco para os extratos EECQ (A), EEFAQ (B), EECA (C) e EEFA (D).



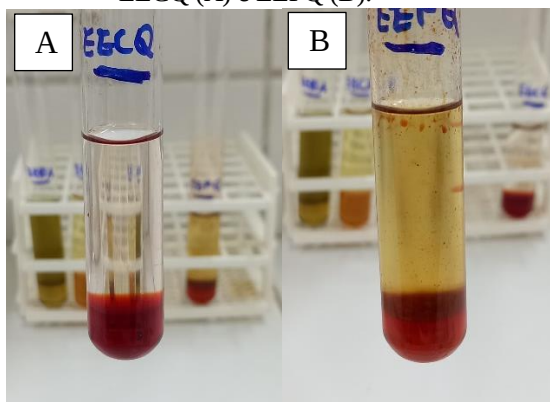
Fonte: O autor (2022)

5.4.7 Quinonas

Pertencem a um grupo de substâncias denominado Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Oxigenados (HPAO), em sua estrutura, apresentam dois grupos carbonílicos em uma cadeia fechada e insaturada de seis membros, na qual essas carbonilas podem se localizar em arranjos “orto” ou “para”. Na maioria das vezes, caracterizam-se como semivoláteis e coloridas. Podem ser classificadas como fentraquinonas, naftoquinonas, benzoquinonas e antraquinonas (NEUBHAHER, 2020). Demonstram um amplo espectro de atividades biológicas, das quais pode-se citar anti-inflamatória, antiviral, antifúngica, antibacteriana, protozoocida, moluscicida, além do potencial anticâncer (SILVA et al., 2021).

No teste para identificar esses metabólitos (4.3.3.8), foi observado uma coloração vermelho intensa na fase aquosa, evidenciando-se a presença desses componentes nos extratos EECQ e EEFAQ, como pode-se observar na Figura 27.

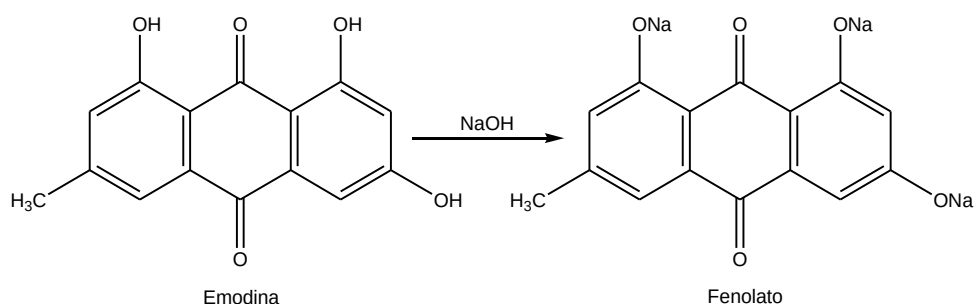
Figura 27. Evidência de quinonas nos extratos EECQ (A) e EEFAQ (B).



Fonte: O autor (2022).

Esta reação em meio alcalino é conhecida como reação de Borntrager, onde as quinonas hidroxiladas se transformam em seus ânions fenolatos correspondentes, os quais apresentam cor intensa. Os fenolatos, nada mais são que sais e, devido a isso, quando são formados migram da fase orgânica para a fase aquosa. A alteração de cor em meio alcalino, também serve para diferenciar alguns esqueletos quinônicos, onde as 1,2-diidroxi-antraquinonas apresentarão cor azul-violeta, enquanto as 1,8-diidroxi-antraquinonas apresentarão cor vermelha, como a que foi observada nos extratos (FALKENBERG, 2007). Uma proposta para essa reação pode ser observada para a 1,8-diidroxi-antraquinona emodina (FIGURA 28).

Figura 28. Reação de Borntrager para a emodina.



Fonte: Adaptado de Devia-Castillo (2019) e Sousa (2019).

5.4.8 Esteroides livres

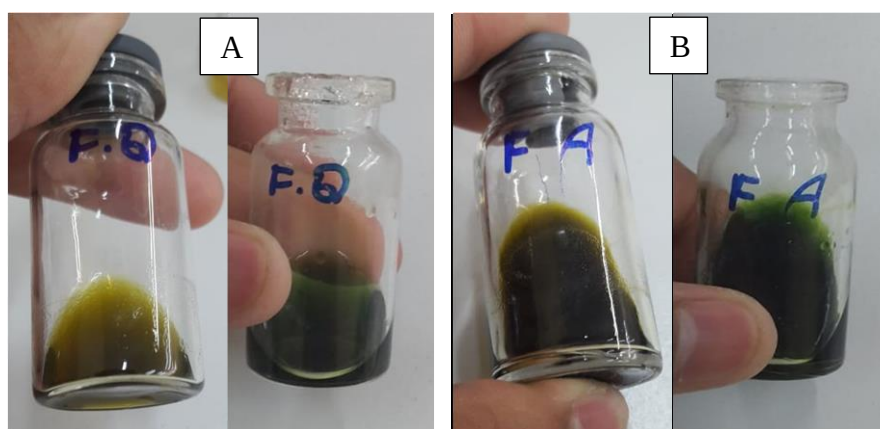
Em geral, os esteroides são triterpenoides modificados, contendo um sistema tetracíclico de lanosterol, mas sem as três metilas em C-4 (2 metilas) e C-14 (1 metila). O colesterol representa uma típica estrutura fundamental para essa classe, onde modificações adicionais,

especialmente na cadeia lateral, contribui para a criação de uma ampla gama de produtos biologicamente importantes. Além da cadeia lateral, os grupos funcionais ligados ao núcleo esteroidal, bem como a estereoquímica dos anéis fusionados são significativos para a atribuição de importantes atividades biológicas para essa classe de compostos (DEWICK, 2009).

Nas plantas, os esteroides encontram-se na composição química das membranas, sua principal classe é compreendida pelos fitoesteroides, equivalentes ao colesterol nos mamíferos (CASTRO, 2018). Os esteroides vegetais são utilizados no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, devido a sua ação na diminuição da absorção de colesterol no intestino (OBARA, 2018).

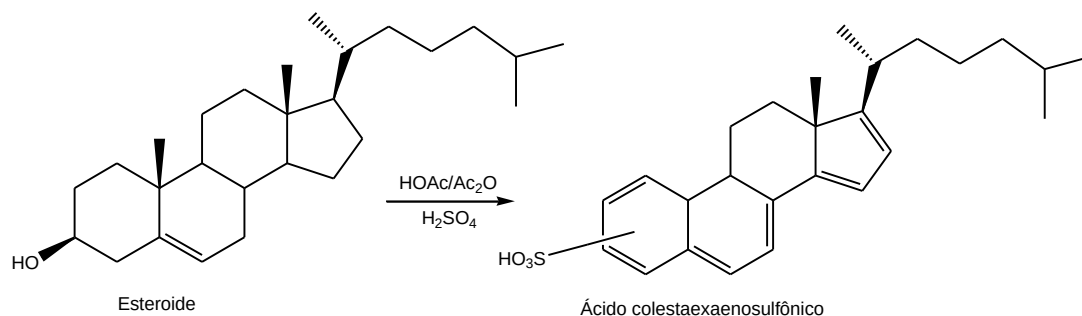
No teste para identificar esteroides e triterpenos (4.3.3.9), foi observado a transição de cor do azul para o verde permanente após a adição do ácido nos extratos EEFAQ e EEFA evidenciando a presença dos esteroides livres, ou seja, aqueles que não estão conjugados com outros grupos, como ésteres e glicosídeos. Pode-se observar a evidência desses compostos na Figura 29.

Figura 29. Evidência de esteroides livres nos extratos EEFAQ (A) e EEFA (B).



Fonte: O autor (2022).

Na reação colorimétrica ocorrida no teste de Liebermann-Buchard (transição do azul para verde permanente), os reagentes promovem a desidratação e desidrogenação no sistema de anéis ciclopentanoperidrofenantreno, formando um esteroide aromático responsável pelo desenvolvimento de cor (FERREIRA, 2016). Um exemplo desta reação em um esteroide pode ser observado na Figura 30.

Figura 30. Reação para identificação de esteroides.

Fonte: Adaptado de Ferreira (2016).

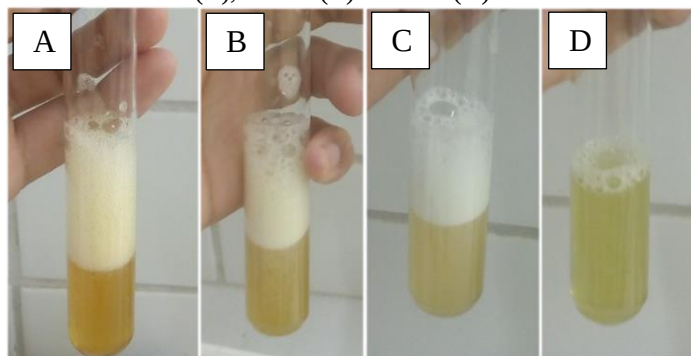
5.4.9 Heterosídeos Saponínicos

São glicosídeos de esteroides ou terpenos policíclico, o que promove o caráter anfifílico de sua estrutura, característica lipofílica (esteroide ou triterpeno) e hidrofílica (açúcares). Nas plantas, estão relacionadas ao sistema de defesa, localizando-se nos tecidos mais vulneráveis a ataques fúngico, bacteriano e predatório dos insetos. Tais atividades estão relacionadas com sua interação com esteróis de membrana, com isso, sendo indicadas como fitoprotetoras (FERNANDES et al., 2019).

Esse grupo de substâncias tem sido de interesse farmacêutico, seja como adjuvante em formulações, componentes ativos em drogas vegetais ou como matéria prima para a síntese de esteroides. Muitas saponinas são capazes de causar uma desorganização das membranas das células sanguíneas (ação hemolítica), ou das células das brânquias de peixes (ação ictiotóxica), além da sua ação antifúngica e hipocolesterolemiantes, devido a complexação com esteroides (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007).

No teste para identificação desses compostos (4.3.3.10), o mesmo foi realizado com o resíduo insolúvel em clorofórmio do teste anterior (4.3.3.9), uma vez que a porção polar (açúcar) as torna insolúvel em solventes orgânicos. Após a dissolução do resíduo em água destilada e a agitação vigorosa, foi observada a formação de uma espuma persistente nos estratos EECQ, EEFAQ, EECA e EEFA, evidenciando a presença dessa classe de metabólitos, como pode-se observar na Figura 31.

Figura 31. Evidência de saponinas nos extratos EECQ (A), EEFQ (B), EECA (C) e EEFA (D).



Fonte: O autor (2022).

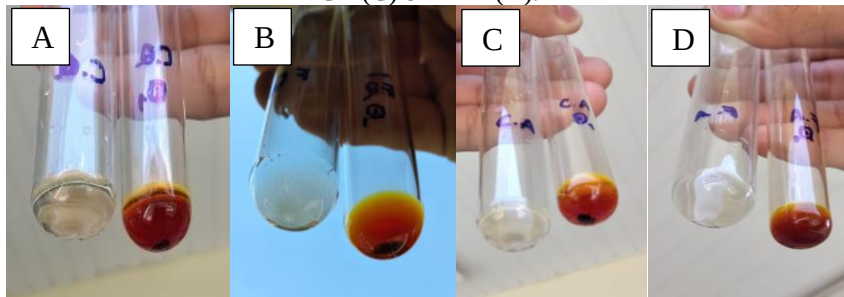
A formação da espuma acontece devido as propriedades detergentes das saponinas, decorrente da sua estrutura anfifílica, a qual tem ação na diminuição da tensão superficial da água (RIBEIRO, 2012).

5.4.10 Alcaloides

Como já discutido, os alcaloides compreendem a classe dos compostos nitrogenados. São metabólitos secundários, também conhecidos como bases nitrogenadas, originam-se na formação ou transformação da matéria proteica. Apresentam gosto amargo e quase todos tem caráter básico. Nas plantas, agem na proteção contra insetos, fungos e bactérias. No organismo humano, devido a sua interação com neurotransmissores, atuam como depressores ou estimulantes do sistema nervoso central (BARRETO, 2018).

No ensaio para a identificação desses compostos (4.3.3.11), utilizando o reagente de Dragendorff, foi observado teste positivo para os extratos EECQ, EEFQ e EECA devido a formação de um precipitado escuro e no EEFA pela turvação da amostra, como indica a metodologia de Matos (2009). Esse teste pode ser observado na figura 32.

Figura 32. Identificação de alcaloides nos extratos EECQ (A), EEFQ (B), EECA (C) e EEFA (D).

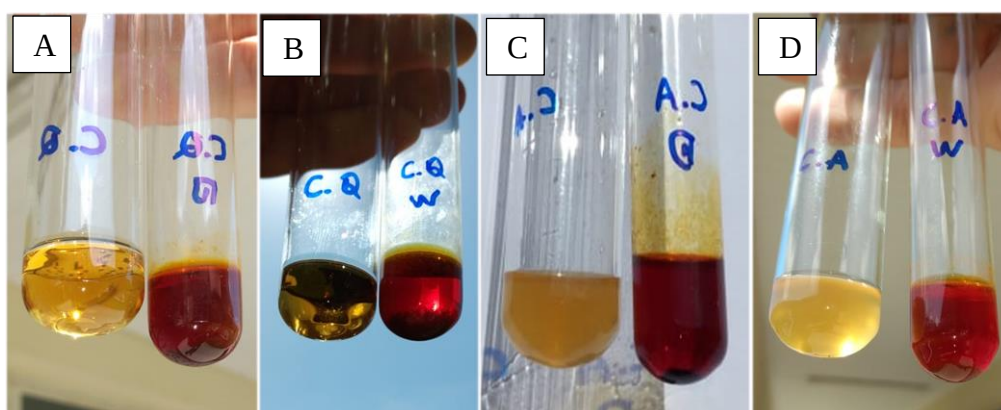


Fonte: O autor (2022).

Os alcaloides, assim como outras aminas, formam sais complexos com alguns metais, os quais podem ser corados e utilizados para identificar essa classe. Vários são os reagentes utilizados na detecção de alcaloides por precipitação, dentre eles, o reagente de Dragendorff (tetraiodobismuto de potássio), o qual foi utilizado no teste 4.3.3.11 e o reagente de Wagner (iodo-iodeto de potássio). Esses precipitados podem ser amorfos ou cristalinos e possuir coloração variando do branco ao amarelo-alaranjado. No entanto, é importante ressaltar que esses precipitados podem ser causados por outras substâncias, como proteínas, purinas, betaínas, entre outros. Com isso, a formação de precipitado pode indicar apenas uma provável presença de alcaloides nos extratos, enquanto teste negativo indica ausência (HENRIQUES et al., 2007).

Devido o provável falso-positivo, foi realizado outro teste (4.3.3.12), desta vez, pela metodologia adaptada de Kloss et al., (2016), onde utilizaram-se dois reagentes, o Dragendorff e o de Wagner. Nessa metodologia, o teste é considerado positivo pela formação de precipitado alaranjado. A partir disso, foi observado teste positivo apenas nos extratos EECQ e EECA, como pode-se observar na Figura 33. Devido os extratos EEFAQ e EEFA testarem positivo pela metodologia do teste 4.3.3.11 e negativo com a metodologia do teste 4.3.3.12, ambos foram indicados como não definidos.

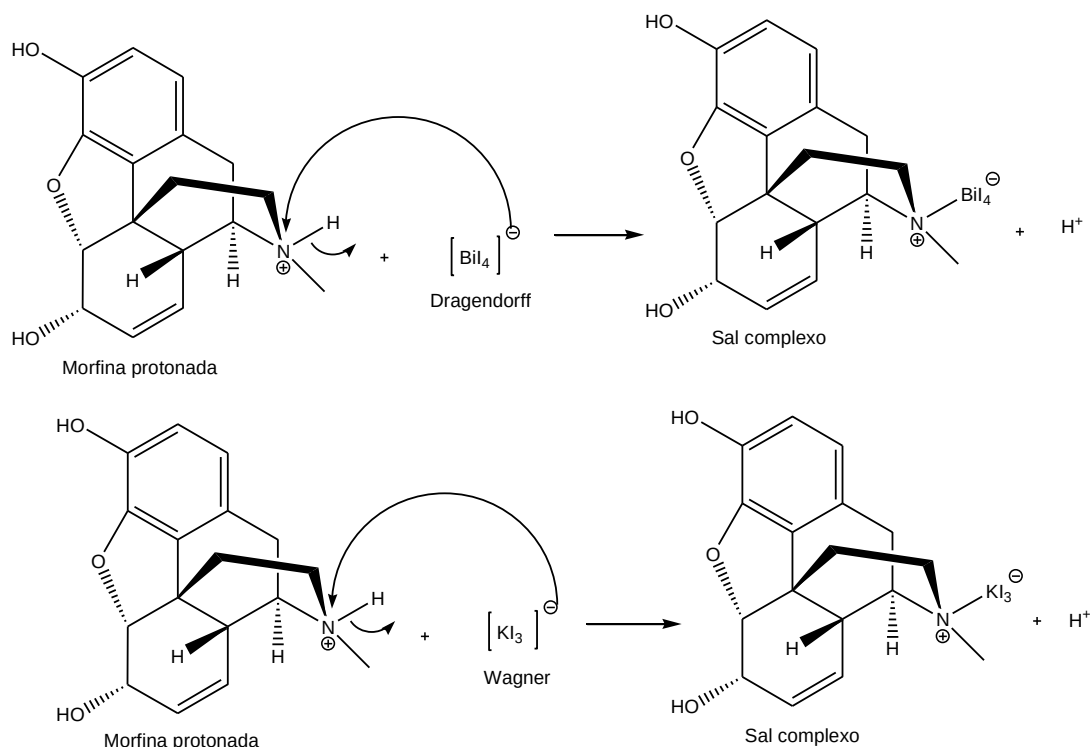
Figura 33. Formação de precipitados nos extratos EECQ (A e B) e EECA (C e D) pelos reagentes de Dragendorff e de Wagner, respectivamente.



Fonte: O autor (2022).

Segundo Sousa (2019), os alcaloides inicialmente são protonados pela ação do ácido e, em seguida, com a adição dos reagentes, forma-se um sal complexo, o qual precipita e exibe uma coloração alaranjada, como mostrado acima na Figura 33. Uma proposta para a reação entre um alcaloide protonado e os reagentes podem ser observadas na Figura 34.

Figura 34. Formação de um sal complexo entre um alcaloide e os reagentes de Dragendorff e Wagner.



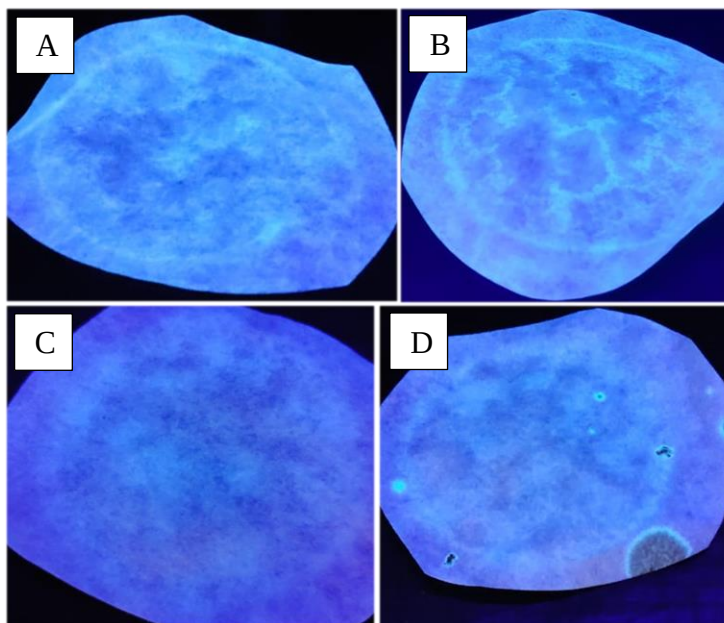
Fonte: O autor (2022), com adaptações de Sousa (2019).

5.4.11 Cumarinas

São heterociclos orgânicos caracterizados como 1,2-benzopirona, pertencente a classe dos neoflavonoides. As estruturas desses compostos podem ser identificadas a partir de um núcleo básico, que consiste em um anel pirano com carbonila na posição 2 fundido a um anel benzeno (FRANCO et al., 2021). Esses compostos são amplamente distribuídos nas plantas (formas livres e glicosiladas), encontradas comumente nas famílias Apiaceae e Rutaceae (DEWICK, 2009). Dentre as atividades e aplicações das cumarinas, pode-se citar antioxidante, anticoagulante, anticancerígena, atuam como inibidores competitivos da vitamina K, como agente de iluminação óptica, citotoxicidade seletiva em células tumorais e crescimento celular, além de ser utilizadas nas indústrias de alimento, cosmético e agroquímica (CASTRO, 2018).

No teste para identificação desses compostos (4.3.3.12), foi observado teste positivo para todos os extratos EECQ, EEFAQ, EECA e EEFA, a partir da visualização de fluorescência verde em 254 e 365 nm, como pode-se observar na Figura 35.

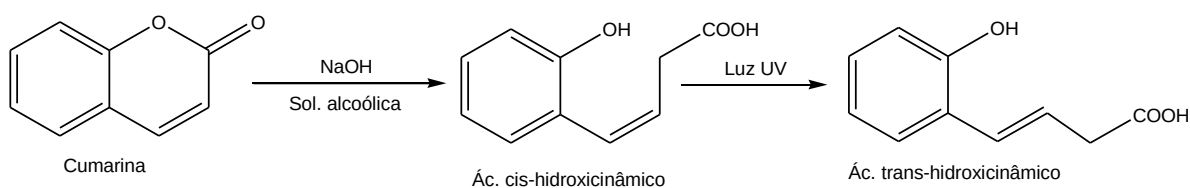
Figura 35. Evidência de cumarinas a partir de fluorescência verde em UV 254 para os EECQ (A) e EEFQ (B) e 365 nm para os extratos EECA (C) e EEFA (D).



Fonte: O autor (2022).

Nesse teste, as cumarinas presente no extrato são volatilizadas por aquecimento e entram em contato com o papel de filtro impregnado com solução de NaOH 10%. Segundo Kuster e Rocha (2007), em meio alcalino, as cumarinas rompem o anel lactônico, formando o ácido *cis*-*O*-hidroxicinâmico, o qual é convertido em seu isômero *trans* na presença de luz UV, desenvolvendo fluorescência. A reação que permitiu a visualização das cumarinas em UV 254 e 365 nm pode ser observada na Figura 36.

Figura 36. Reação de formação e isomerização do ácido *cis*-hidroxicinâmico.



Fonte: Adaptado de Sousa (2019).

Dentre as classes de metabólitos relatadas nos testes fitoquímicos, para a espécie *C. hexandra*, na literatura já havia relatos dos constituintes das classes dos flavonoides, esteroides e taninos condensados para ambos os estratos (EECQ e EEFQ), já alcaloides e cumarinas apenas no extrato EECQ (OLMEDO et al., 2007; CARVALHO, 2009; NUNES et al., 2012).

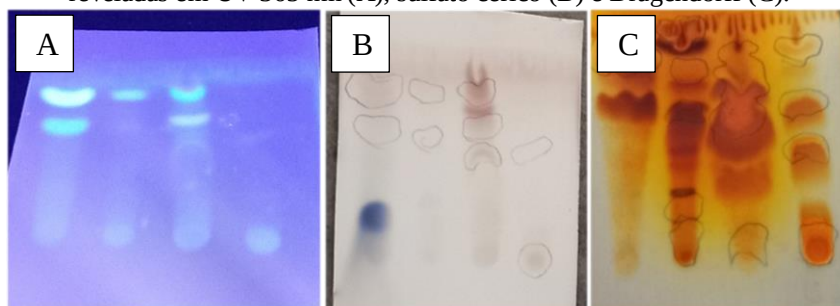
Portanto, a pesquisa traz novas informações sobre a presença de cumarinas no extrato das folhas e a presença de quinonas em ambos os extratos.

Já para a espécie *A. rugulosa*, a literatura relata apenas esteroides e alcaloides nas folhas (VENDRAMIN et al., 2013; BRUGINSKI, 2016; PAULA, 2019). Dessa forma, a classe dos flavonoides, cumarinas e quinonas são novos dados para a folha (EEFA). Por outro lado, a literatura não fornece nenhum estudo sobre o caule dessa espécie, com isso, todas as classes de metabólitos que deram positivo para o EECA (taninos condensados, flavonoides, quinonas, esteroides livres, heterosídeos saponínicos, alcaloides e cumarinas) são novidades.

5.5 EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE

Na extração ácido-base (4.3.4.1), os extratos foram diluídos com HCl 0,1 % a fim de protonar os alcaloides presentes nos extratos do caule de ambas as espécies. Isso, pois a maioria dos alcaloides são constituídos por aminas primárias, secundárias e terciárias (DE REZENDE et al., 2016) e, no meio ácido, são protonados e passam a ser solúveis em meio aquoso. Após a primeira extração, a fase aquosa foi alcalinizada para que os alcaloides percam os prótons e passem a ter menos afinidade com a água e, com isso, fez-se a sua extração com clorofórmio. A partir disso, ambos os extratos da primeira (ECICQ-1 e ECICA-1) e segunda (ECICQ-2 e ECICA-2) extração foram submetidos a uma análise preliminar em CCD. A seguir, é possível observar na Figura 37, placas reveladas em luz UV 365 nm (A), sulfato cérico (B) (eluição em hexano/AcOEt 8:2) e em Dragendorff (C) (eluição em CHCl₃/MetOH 9:1), na seguinte ordem de aplicação: ECICA-1/ ECICA-2/ ECICQ-1/ ECICQ-2.

Figura 37. CCD dos extratos ECICQ-1, ECICQ-2, ECICA-1 e ECICA-2 reveladas em UV 365 nm (A), sulfato cérico (B) e Dragendorff (C).



Fonte: O autor (2022).

A partir da revelação das placas, observa-se que o ECICA-1 apresenta fluorescência verde e azul em UV 365 nm, uma mancha azul em sulfato cérico, em Dragendorff uma mancha escura. O ECICA-2 apresentou fluorescência azul em UV 365 nm e algumas manchas escuras (outras mais claras, mas indefinidas) em Dragendorff. O ECICQ-1 apresentou as fluorescências verde e azul em UV 365 nm, manchas marrons claras e pouco definidas em sulfato cérico, e manchas escuras e claras, mas indefinidas, em Dragendorff. Por fim, o ECICQ-2, apresentou leve fluorescência no ponto de aplique em UV 365 nm e uma mancha alaranjada característica na placa revelada em Dragendorff.

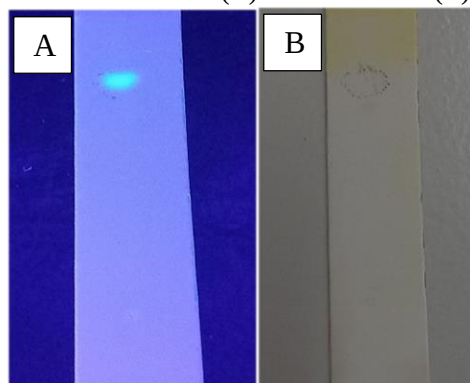
Quando irradiada por luz UV 365 nm, os flavonoides, dependendo da estrutura, podem apresentar fluorescências amarelo, azul ou verde, mas o azul intenso é mais relacionado às cumarinas. Já na revelação em sulfato cérico, infere-se que a cor azul se dar por substâncias terpênicas. Por fim, em Dragendorff, a mancha alaranjada indica a presença de alcaloides (CHAVES, 1997; PALENCIA, 2004; TANANTA, 2012; SILVA, 2021; HENRIQUES et al., 2007).

5.5.1 Cromatografia em Coluna (CC) de gel de sílica

A Cromatografia em Coluna (CC) é uma técnica onde a fase estacionária é mantida em um tubo estreito e a fase móvel é forçada através do tubo por pressão ou por efeito da gravidade. A coluna consiste em um tubo estreito recheado com um sólido inerte finamente dividido que retem a fase estacionária na sua superfície. A fase móvel ocupa os espaços entre as partículas do sólido. Inicialmente, a amostra contendo a mistura dos constituintes a serem separados, é introduzida na “cabeça” da coluna, onde os componentes se distribuirão entre a fase móvel e a estacionária. Deste modo, a eluição ocorrerá forçando os componentes da mistura através da coluna, introduzindo a fase móvel continuamente e, com a diferença na velocidade com que cada constituinte desce na coluna, consegue-se coletá-los separadamente (SKOOG et al., 2010).

A amostra ECICQ-1 foi submetida a essa técnica, conforme o fracionamento cromatográfico descrito na Figura 11 (4.3.4.2). Após a coleta das frações, análise em CCD e união das frações similares, um dos grupos de frações (I) foi submetido a purificação em mini coluna (coluna: pipeta de vidro), resultando na primeira substância (**Substância 1**) supostamente isolada, com 10,2 mg, a CCD dessa substância eluída em hexano/AcOEt (8:2) revelada em luz UV 365 nm e sulfato cérico pode ser observada na Figura 38 (A) e (B), respectivamente.

Figura 38. CCD da substância 1 revelada em luz UV 365 nm (A) e sulfato cérico (B).

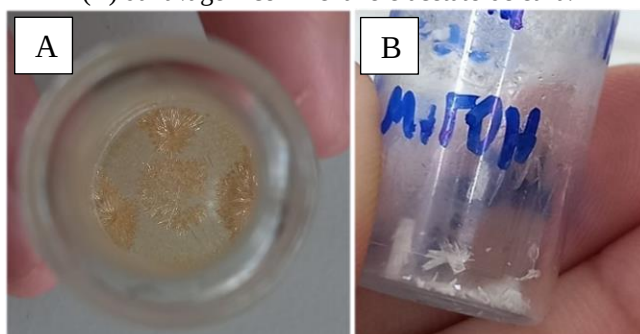


Fonte: O autor (2022).

Como pode-se observar, a **substância 1** exibe fluorescência verde ao ser excitada pela radiação UV 365 nm e em sulfato cérico, não mostra nenhuma coloração. Com isso, pode-se inferir que pode se tratar de um flavonoide ou cumarina (TANANTA, 2012; SILVA, 2021; HENRIQUES et al., 2007). A presença de cumarinas é largamente relatada para essa espécie, sendo as principais substâncias isoladas (OLMEBO et al., 2007), cerca de 23 de um total de 34.

Outro grupo de frações (II) formaram um precipitado (Figura 39 A), o qual foi lavado com hexano e acetato de etila, tornando-se mais limpo, podendo ser visualizado como um precipitado branco cristalino de 27,2 mg (Figura 39 B).

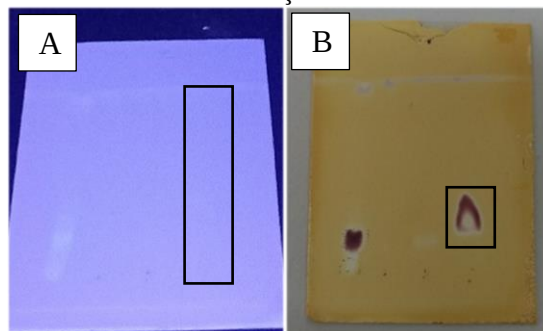
Figura 39. Precipitado do grupo de frações II antes (A) e depois (B) da lavagem com hexano e acetato de etila.



Fonte: O autor (2022).

Após a lavagem, o precipitado lavado e as extrações em hexano e AcOEt foram submetidas a análise CCD, com eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) e reveladas em luz UV 365 nm e sulfato cérico. Na figura 40, pode-se observar essa CCD com a seguinte ordem de aplicação: extração hexânica/extração AcOEt/precipitado lavado.

Figura 40. CDD revelada em luz UV 365 nm (A) e sulfato cérico (B) do precipitado e lavagens do grupo de frações II.



Fonte: O autor (2022).

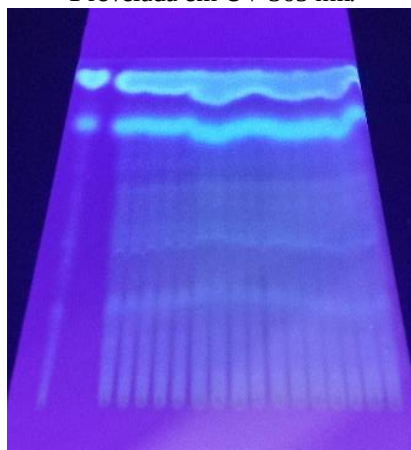
Como pode-se observar, apenas o precipitado lavado apresenta-se fisicamente como um composto puro (**Substância 2**), o qual não revelou em UV 365 nm, enquanto apresentou uma mancha rosa roxeada em sulfato cérico. Segundo Chaves (1997) e Tananta (2012) tal coloração indica a presença de terpenos. A presença dessa classe de substância é relatada na literatura para essa espécie (LIMA, 2009).

5.5.2 Cromatografia Preparativa (CP) – gel de sílica

Muito semelhante a CCD (5.3), a Cromatografia Preparativa (CP) se utiliza da capilaridade para separar os componentes de uma mistura. O diferencial da CP é a maior espessura do adsorvente (sílica gel), o que permite aplicar uma maior quantidade de amostra e isolar um componente de interesse. Geralmente, é utilizada para isolar compostos fenólicos, triterpenos, ácidos carboxílicos e ácidos graxos. Após a eluição, é recomendável a utilização de reveladores não destrutivos, como a luz UV, nos comprimentos de 254 e 365 nm, pois uma grande parte dos produtos naturais possuem grupos (cromóforos), que absorvem nesses comprimentos de onda, desenvolvendo fluorescência (FERREIRA, 2019 b).

Foi utilizada essa técnica para a amostra ECICA-1, conforme o fracionamento cromatográfico da Figura 12 (4.3.4.2). Após a eluição em hexano/AcOEt (8:2), a placa foi revelada em luz UV 365 nm, como pode-se observar na Figura 41.

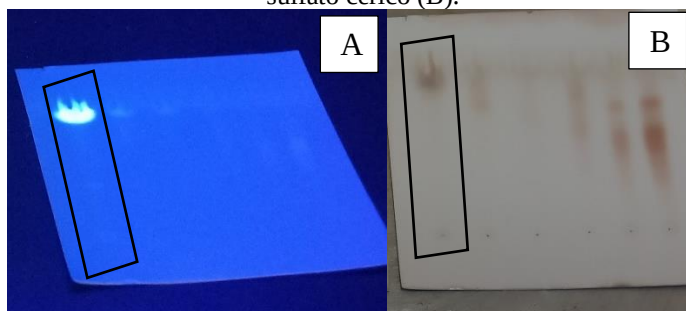
Figura 41. PC da amostra ECICA-1 revelada em UV 365 nm.



Fonte: O autor (2022).

Após a extração das substâncias e análise em CCD, verificou-se que a fração fluorescente mais no topo da placa apresentava um maior grau de pureza, com isso, a mesma foi submetida a uma purificação em minicolumna resultando na **substância 3**. A seguir, na Figura 42, verifica-se uma CCD eluída em hexano/AcOEt (8:2), contendo a substância isolada, revelada em luz UV 365 nm e sulfato cérico.

Figura 42. CCD da substância 3 revelada em luz UV 365 nm (A) e sulfato cérico (B).



Fonte: O autor (2022).

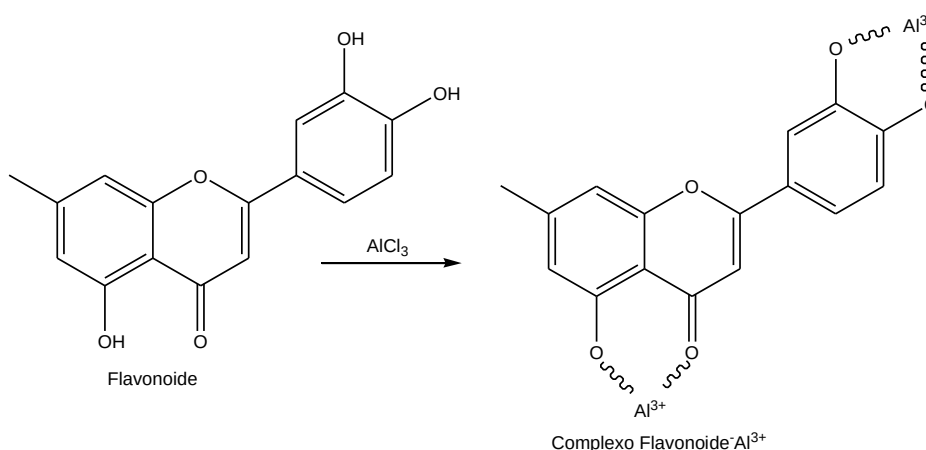
Observa-se então, a partir da CCD, que a **substância 3** emite fluorescência azul intenso em 365 nm, característico de cumarinas (TANANTA, 2012). Além disso, em sulfato cérico, aparece um cinza que é característico de açúcar (CHAVES, 1997), no entanto, os glicosídeos tornam a substância muito polar devido as suas hidroxilas, e a substância 3 foi a mais apolar da amostra, tendo em vista que se localizava no topo da placa. Desta forma, suponha-se que a mancha cinza não estar relacionado a açúcares, mas a algum produto reacional decorrente do sulfato cérico e o aquecimento.

Para a determinação estrutural inequívoca dos compostos, as substâncias isoladas foram encaminhadas para análises de RMN ^1H e ^{13}C , no Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar-SP.

5.6 AVALIAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

A determinação do teor de flavonoides foi realizada por espectrofotometria de absorção molecular. Para as medidas de absorbância dos extratos, foi adicionado à solução de cloreto de alumínio, que na presença de flavonoides formar um complexo estável, o qual absorve um comprimento de onda específico (MARCUCCI et al., 2021). A reação de complexão dos flavonoides com o cloreto de alumínio pode ser observada na Figura 43.

Figura 43. Reação de complexação flavonoide- Al^{3+} .



Fonte: Adaptado de Marcucci et al. (2021).

Os flavonoides são compostos polifenólicos encontrados em vegetais, mas que não são sintetizados no organismo humano. A importância do seu estudo está relacionada às propriedades farmacológicas dessa classe de compostos, das quais destaca-se a atividade antioxidante, antiviral, antimicrobiana e anti-inflamatória (CASTELO et al., 2020). Dessa forma, foi realizado o teste para determinar o teor de flavonoides totais presente nos extratos EECQ, EEFQ, EECA e EEFA, conforme a metodologia de Pozzi (2007) com modificações (4.3.5.3). A seguir, na Tabela 6, pode-se observar o teor de flavonoides totais (FLAT) calculado.

Tabela 6. Teor de flavonoides totais para os extratos das espécies estudadas.

EXTRATOS	FLAT (mg de ER/g de extrato)
EECQ	61,38 ± 0,11
EEFQ	146,96 ± 1,01
EECA	27,08 ± 0,58
EEFA	105,44 ± 2,11

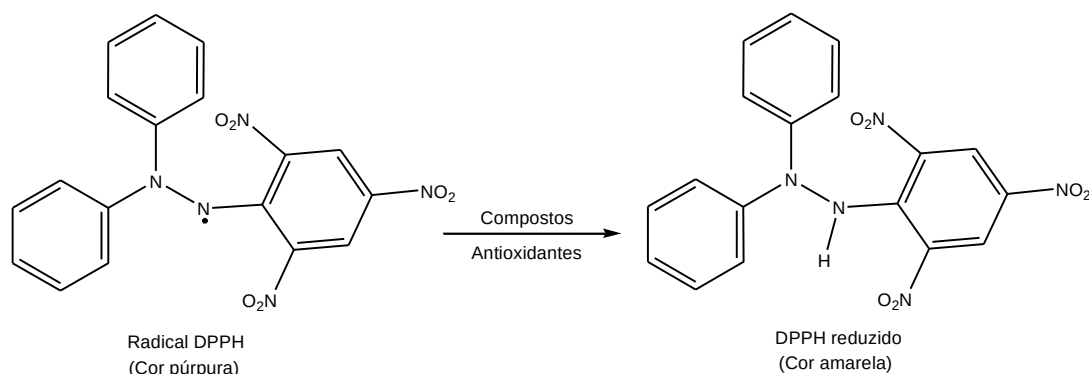
Fonte: O autor (2022).

A partir dessa tabela, percebe-se que os extratos das folhas de ambas as espécies apresentaram um teor de flavonoides superior aos caules. A maior concentração de flavonoides nos extratos das folhas (EEFQ e EEFA), pode estar relacionada ao fato dos flavonoides apresentar função de proteger a planta contra o estresse oxidativo causado pela radiação UV e, como as folhas estão mais expostas, é justificável as mesmas conter a maior concentração desses compostos (COIMBRA, 2019).

Para a espécie *A. rugulosa*, não há estudos na literatura sobre o teor de flavonoides totais. Portanto, essa pesquisa contribui com dados inéditos sobre essa classe de compostos na planta. Para a *C. hexandra*, Nunes et al. (2012), encontra valores de $30,6 \pm 0,760$ para o caule e $08,0 \pm 0,307$ para as folhas (mg ER/g da amostra seca). Os valores distintos dos encontrados por Nunes et al. (2012) pode estar relacionado a fatores como luminosidade, temperatura, pluviosidade, sazonalidade, radiação ultravioleta, composição atmosférica, além das interações bióticas (MARTINS, 2019). Tais fatores mudam de região para região e são determinantes, quantitativamente, na biossíntese de metabólitos secundários.

5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES (DPPH•)

Nesse teste, é monitorado o consumo do radical pela amostra em diferentes concentrações através do decréscimo da absorbância do DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazil). A técnica utilizada, foi espectrofotometria (comentada no item 5.3), onde a absorbância do radical foi analisada em 516 nm. O DPPH•, ocorre como um radical livre estável que reage com compostos capazes de doar hidrogênio ou elétrons (antioxidantes) resultando na mudança de sua coloração (FABIANE, 2019). A variação de coloração ocorre da cor púrpura para amarela devido a redução do DPPH• a 2,2-difenil-1-picrilidrazina (DPPH), tendo como consequência, o decréscimo da absorbância (SOUSA, 2019). A reação de redução do DPPH• pode ser observada na Figura 44.

Figura 44. Reação de redução do DPPH•.

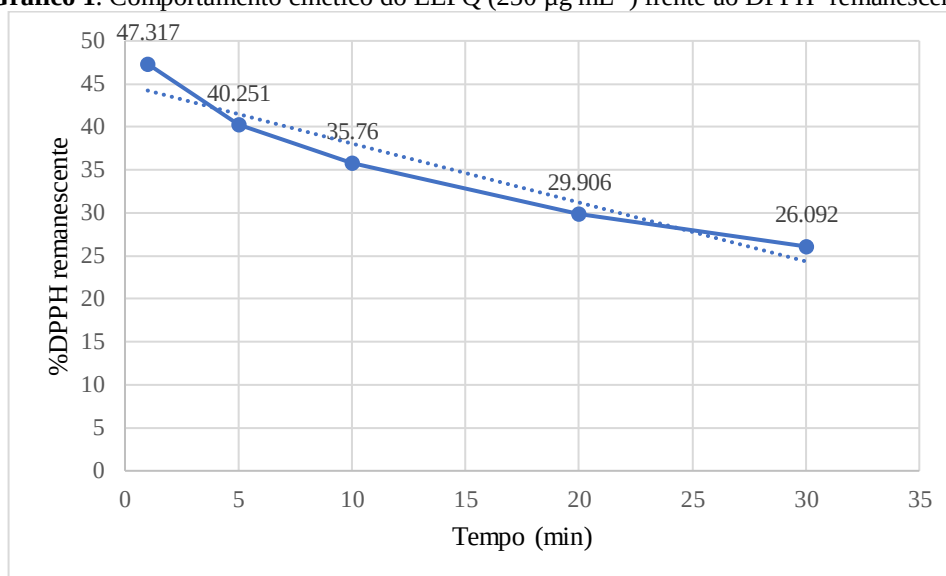
Fonte: Adaptado de Oliveira, Barbosa e Flores (2021).

A atividade antioxidante de extratos vegetais é largamente estudada por sua importância no tratamento e prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e renais, as quais estão associadas aos danos causados pelo estresse oxidativo em biomoléculas. Vegetais ricos em compostos fenólicos tendem a capturar espécies radicalares, protegendo o organismo contra os danos causados por essas espécies (BARROS et al. 2021). Dessa forma, foi realizada a avaliação da atividade antioxidante do EEFAQ pelo método de sequestro de radicais livre, utilizando o DPPH•, conforme a metodologia de Sousa et al. (2007). Os demais extratos ainda estão em análise. O resultado da atividade antioxidante (AA%) em diferentes concentrações pode ser observado na Tabela 7, e a cinética da reação com o EEFAQ na concentração de 250 µg.mL⁻¹ no Gráfico 1.

Tabela 7. Teor de inibição do DPPH• (AA%) para o EEFAQ e controles (rutina e BTH) após 30 min de reação.

AMOSTRAS			
DPPH AA% ± DP	EEFAQ	Rutina	BTH
25 µg mL ⁻¹	18,668 ± 1,86	28,41 ± 1,19	25,41 ± 1,82
50 µg mL ⁻¹	27,672 ± 2,96	48,79 ± 6,60	39,55 ± 3,99
100 µg mL ⁻¹	39,437 ± 4,53	85,09 ± 4,68	61,02 ± 2,11
150 µg mL ⁻¹	54,476 ± 5,05	93,72 ± 1,14	73,58 ± 1,84
200 µg mL ⁻¹	67,657 ± 6,27	93,90 ± 0,45	83,03 ± 2,37
250 µg mL ⁻¹	75,968 ± 5,59	94,14 ± 0,22	89,88 ± 0,83

Fonte: O autor (2022).

Gráfico 1. Comportamento cinético do EEFQ ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) frente ao DPPH• remanescente.

Fonte: O autor (2022).

A partir da Tabela 7 observa-se que o EEFQ na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentou valores de percentual de atividade antioxidante (AA%) abaixo dos controles positivos. Isso, pois os testes fitoquímicos mostraram que a composição do extrato vai além dos compostos fenólicos, os quais são considerados os principais compostos com potencial antioxidante (DE OLIVEIRA et al., 2021). Apesar disso, Everton et al. (2018), aborda que o AA% pode ser considerado forte, intermediário e fraco quando inibe acima de 70%, entre 70 e 50% e abaixo de 50%, respectivamente, com isso, o EEFQ apresentou forte potencial antioxidante.

No Gráfico 1, através da curva dose-resposta correspondente ao decréscimo de %DPPH• remanescente em função do tempo, observa-se que o EEFQ apresenta uma cinética rápida, tendo em vista que inibiu mais de 50% do radical no primeiro minuto.

O cálculo da CE_{50} forneceu o valor de $144,20 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 21,63$. Pelo mesmo método, mas metodologias diferentes, Nunes et al. (2012) e Lima (2009) também realizaram o teste antioxidante frente ao DPPH•, obtendo-se a CE_{50} de $99,57 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $12,24 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A obtenção dos extratos pelos autores da literatura e dessa pesquisa, foi realizada com um percentual diferente de EtOH. A AA%, pode ser influenciada pelo método de extração, e a escolha do solvente pode diminuir ou aumentar a quantidade compostos fenólicos e, por consequência, a atividade antioxidante (TORRES et al., 2018).

5.8 TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

A *A. salina* é microcrustáceo de água salgada pertencente ao nível trófico de consumidores primários. Apresentam baixa tolerância a alterações ambientais e alta especificidade a interferências externas, por esse motivo, é utilizada em diversos estudos de toxicidade, garantindo resultados nítidos mesmo com pequenas variações de qualidade de ambiente. Com isso, é possível determinar por ensaios de toxicidade aguda, a Concentração Letal para 50% da população teste (CL_{50}) de extratos vegetais (LIMA et al., 2019).

A sociedade utiliza as plantas medicinais com uma idealização equivocada de que, por ser natural, não provoca danos à saúde. Muitas substâncias químicas, assim como extratos vegetais, apresentam um potencial efeito tóxico, cujo efeito varia com a concentração. Dessa forma, para garantir a segurança no uso de uma planta, bem como produtos derivados, como fitoterápicos e fitofármacos, se faz necessário a realização de testes que demonstram os níveis de toxicidade baseada na concentração (DA SILVA et al., 2021; PEREIRA; MONTEIRO; SIQUEIRA, 2020).

A partir disso, foi realizado o teste de toxicidade frente à *A. salina* para os extratos EECQ, EEFAQ, EECA e EEFA conforme a metodologia de McLaughlin et al. (1991). A seguir, na Tabela 8, encontram-se os valores de (CL_{50}), a qual foi determinada com um limite de confiança de 95%.

Tabela 8. Toxicidade dos extratos EECQ, EEFAQ, EECA e EEFA frente a *A. salina*.

EXTRATOS	CL_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
EECQ	4168,69
EEFAQ	80005,71
EECA	199,75
EEFA	1570,36

Fonte: O autor (2022).

Como pode-se observar, o EECA apresentou maior toxicidade seguido do EEFA, EECQ e o EEFAQ com menor toxicidade. O EEFAQ não apresentou toxicidade nas concentrações de 100-2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a determinação da sua CL_{50} , foi realizada a partir da equação $y=127,25\ln(x)-153,76$ e $R^2=0,9547$, obtidos a partir de uma extrapolação logarítmica. Senigalia et al. (2020), destaca que “se a CL_{50} for maior do que 1000 $\mu\text{g/mL}$, o extrato é considerado atóxico, entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresenta baixa toxicidade, entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ moderada toxicidade e menor que 100 $\mu\text{g/mL}$, alta toxicidade”. Desta forma, os extratos EECQ, EEFAQ e EEFA são considerados atóxicos, enquanto o EECA é considerado moderadamente tóxico. Na literatura, não há dados referentes a teste de toxicidade frente a *A. salina* para ambas as espécies.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As exsiccatas das espécies *C. hexandra* e *A. rugulosa* foram depositadas no herbário da Universidade Federal do Delta do Parnaíba sob os números de tombo 6975 e 6976, respectivamente. Os extratos EECQ (caule/quina-quina), EEFAQ (folha/quina-quina), EECA (caule/anona) e EEFA (folha/anona) apresentaram rendimento de 5,36%; 9,55%; 6,53% e 19,8%, respectivamente.

A CCD apresentou indicativo da presença de flavonoides para ambos os extratos, terpenos para os EEFAQ, EECA e EEFA, açúcares para os EECA e EEFA e cumarinas para o EECA. Os testes fitoquímicos, revelaram a presença de taninos flobatênicos, chalconas e auronas, diidroflavonois, quinonas, heterosídeos saponinínicos e cumarinas para o EECQ e EEFAQ, os alcaloides foram observados apenas no EECQ, enquanto os esteroides livres apenas no EEFAQ. Para o EECA e EEFA destacaram-se os flavonois, heterosídeos saponínicos e cumarinas, os alcaloides foram identificados apenas no EECA e os esteroides livres apenas no EEFA. A presença de cumarinas no EEFAQ, quinonas no EECQ e EEFAQ, flavonoides, cumarinas e quinonas no EEFA e taninos condensados, flavonoides, esteroides livres, heterosídeos saponínicos, alcaloides e cumarinas no EECA estão sendo relatados pela primeira vez.

Por cromatografia em coluna e preparativa, foram isoladas três substâncias. Pelas análises qualitativas de CCD referem-se a um composto fenólico (cumarina ou flavonoide – **substância 1**/10,2 mg), uma substância de natureza terpênica (**substância 2**/ 27,2 mg) para o EECQ uma cumarina (**substância 3**/11,4 mg) para o EECA. Para a determinação estrutural inequívoca dos compostos, as substâncias isoladas foram encaminhadas para análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C , no Laboratório de Produtos Naturais da Ufscar-SP.

No teste para calcular o teor de flavonoides (FLAT), o EECQ, EEFAQ, EECA e EEFA apresentaram $61,38 \pm 0,11$; $146,96 \pm 1,01$; $27,08 \pm 0,58$ e $105,44 \pm 2,11$ (mg de ER/ g de extrato), respectivamente. A atividade antioxidante para o EEFAQ ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi considerada forte, pois apresentou AA% de $75,966 \pm 5,59$ e CE_{50} de $144,20 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 21,63$. Para o teste de toxicidade os extratos EECQ, EEFAQ e EEFA foram considerados atóxicos, pois apresentaram CL_{50} de 4168,69; 80005,71; 1570,36 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivamente. O EECA apresentou moderada toxicidade devido a CL_{50} de 199,75 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os valores de FLAT para o EECA e EEFA, e a toxicidade frente a *A. salina* para ambas as espécies estão sendo relatadas pela primeira vez.

Portanto, esse trabalho contribui para o conhecimento químico-biológico das espécies *Coutarea hexandra* e *Annona rugulosa*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-BEZERRA, J. W. et al. Alelopatia? Não sei! Nunca Vi! Eu só ouço falar!. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, p. e19391210873-e19391210873, 2020.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas Medicinais**. 3 ed. Salvador: EDUFBA, 2011.
- ANDRADE, L. P. **Extração e biotransformação de flavonoides a partir de resíduo de indústria cítrica**. 2019. 75 f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara-SP, 2019.
- AQUINO, R. et al. 4-Arylcoumarin glycosides from *Coutarea hexandra*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 6, p. 1827-1830, oct, 1988.
- ARAÚJO, C. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana do composto 5,7,2',5'-tetraacetoxi-4-fenilcumarina obtido a partir de *Coutarea hexandra* (Rubiaceae). **Revista de microbiologia**, v. 19, pp. 177-179, 1988.
- BARREIROS, A. L. B. S. **Constituintes químicos bioativos de *Dioclea violacea***. 2005. 286 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.
- BARRETO, J. K. M. **Perfil de compostos fenólicos e alcaloides da ayahuasca**. 2018. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Nutrição) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.
- BARROS, N. V. A. et al. Bioacessibilidade in vitro de compostos fenólicos e atividade antioxidante em cultivares biofortificadas de feijão-caupi. **Revista Ciência Agronômica**, v. 52, 2021.
- BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 545, 2008.
- BIBA, V. S. et al. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activity of Annonaceae family. **World J. Pharm. Pharm. Sci**, v. 3, p. 1595-1604, 2014.
- BITENCOURT, H. R. et al. Síntese de chalconas. Cap 7. Vol 6. **Processos Químicos e Biotecnológicos**, 2020.
- BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v.11, n.1, p.54-67, 2020.
- BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 1, p. 18, may, 2007.
- BRUGINSKI, E. R. D. **Identificação de alcaloides e acetogeninas diretamente em tecidos de folhas e sementes de *Annona rugulosa* (Annonaceae) por DESI-MSI**. 2016. Dissertação

(mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CANDIDO, L. P.; CAVALCANTI, M. T.; BESERRA, E. B. Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 420-425, aug, 2013.

CARVALHO, I. M. M. **Avaliação da atividade antihepatotóxica de duas espécies vegetais popularmente conhecidas como “quina”**: *Strychnos pseudoquina* A. St. Hil. e *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum. 2009. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em em Bioquímica e Biologia molecular de plantas; Bioquímica e Biologia molecular de animais. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CARVALHO, J. C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 519-520p.

CASTELO, R. M. et al. Determinação de fénois e flavonoides totais dos galhos de *Jatropha mollissima* (POHL) Baill.(Pinhão-Bravo). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 52147-52154, 2020.

CASTRO, A. N. **Hiperpolarizabilidade molecular de segunda ordem e homo-lumo dos derivados de cumarinas e neolignanas**. 2018. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) – Programa de Pós-Graduação Stricto Senso em Ciências Moleculares da Universidade Estadual De Goiás. Anápolis, 2018.

CASTRO, G. L. R. **Controle de qualidade de cápsulas de *Morus nigra* L.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso da Universidade de Brasília, 2018. Disponível em: <https://bdm.unb.br/handle/10483/23965>. Acessado em 30 de jan de 2022.

CAVALHEIRO, C. S. **Extração, Separação e Identificação de Alcalóides Indólicos em *Tabernaemontana catharinensis***. Relatório de Estágio Supervisionado para o Curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul. Caxias do Sul, 2017.

COIMBRA, E. Q. **Compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante de extratos metanólicos de *Senna rugosa***. 2019. 27 f. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal e Uberlândia. Patos de Minas, 2019.

COUTO, L. C. et al. Taninos vegetais ou polifenóis. Diamantina: **UFVJM**, 2021. Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/2665>. Acessado em 18 de jan de 2022.

COUVREUR, T. L. P. et al. Early evolutionary history of the flowering plant family Annonaceae: steady diversification and boreotropical geodispersal. **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 4, p. 664-680, 2011.

CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina "química orgânica". **Química Nova**, v. 20, p. 560-562, 1997.

CUNHA, A. L. et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

D'AGOSTINO, M. et al. Isolation of 8-Hydroxy-5, 7, 3', 4'-tetramethoxy-4-phenylcoumarin from *Coutarea hexandra*. **Planta medica**, v. 55, n. 06, p. 578-578, feb, 1989a.

D'AGOSTINO, M. et al. A 4-aryl coumarin from *Coutarea Hexandra*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 6, p. 1773-1774, 1989b.

D'AGOSTINO, M. et al. Isolation of 8, 3'-Dihydroxy-5, 7, 4'-trimethoxy-4-phenylcoumarin from *Coutarea hexandra*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 1, p. 161-162, feb, 1990.

DA SILVA ALMEIDA, J. R. G. et al. Prospecção tecnológica do gênero *Annona* (annonaceae). **REVISTA GEINTEC-GESTAO INOVACAO E TECNOLOGIAS**, v. 4, n. 2, p. 850-858, 2014.

DA SILVA, M. G. et al. A importância dos ensaios de toxicidade para o desenvolvimento e o registro de fitoterápicos no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e538101220137-e538101220137, 2021.

DE MOURA, D. F.; MARTINS, R. D.; DA SILVA, M. V. Nerolidol: fitoconstituente de óleos essenciais de plantas da caatinga. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 12, p. 33402-33416, 2019.

DE OLIVEIRA, D. P. et al. Perfil fitoquímico e potencial antioxidante de extratos etanólicos da espécie *Bauhinia monandra* Kurz (Fabaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 86551-86564, 2020.

DE REZENDE, F. M. et al. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **Laboratório de Ensino de Botânica**, p. 93, 2016.

DEVIA-CASTILLO, Beatriz O. et al. Primer reporte de antraquinonas en hojas de *Picramniagrácilistul*. **Revista Cubana de Química**, v. 31, n. 3, p. 414-426, 2019.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 2009. 187p. 234p. 546p.

DOS SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 403-404p.

DUARTE, M. R.; OLIVEIRA, R. B.; SOUZA, D. C. leaf and stem anatomy of two species of *Rollinia* (ANNONACEAE): *R. rugulosa* and *R. mucosa*. **Visão Acadêmica**, v. 16, n. 3, 2016.

EVERTON, G. O. et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana das folhas e frutos de *Citrus limon* (L.) Burn (limão siciliano). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 23, n. 4, 2018.

FABIANE, K. C. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos vegetais de folhas de espécies nativas de Myrtaceae**. 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2019.

FALKENBERG, M. B. QUINONAS. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 657p.

FARIAS, A. R. B. **Análise proteômica quantitativa de folhas, raízes e sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) com teores contrastantes de ésteres de forbol**. 2019. 125 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

FELIPE, L. O. et al. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FERNANDES, B. F. et al. Estudo etnofarmacológico das plantas medicinais com presença de saponinas e sua importância medicinal. **Revista da Saúde da AJES**, v. 5, n. 9, 2019.

FERREIRA, L. C. **Extração e isolamento de compostos antioxidantes das folhas de *Syzygium malaccense* utilizando técnicas cromatográficas**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019. (b)

FERREIRA, L. M. B. **Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antifúngico de *Sida ciliaris* Linné (Malvaceae)**. 2016. 58 fl. (Trabalho de Conclusão de Curso – Monografia), Curso de Bacharelado em Farmácia, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité – Paraíba – Brasil, 2016.

FERREIRA, M. D. L. **"Terpenos: potenciais agentes quimioterapêuticos obtidos de fontes naturais usados contra o câncer de pulmão."**. 2014. 38 f. Monografia (graduação em farmácia) – Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

FERREIRA, R. C. **Estudo da reatividade do estado excitado triplete de xantonas dimetoxiladas empregando a técnica de fotólise por pulso de laser**. 2019. 170 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2019. (a)

FONSECA, W. O. et al. A família Rubiaceae no Parque Nacional de Boa Nova, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 47, 2020.

FRANCO, D. P. et al. A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. **Química Nova**, v. 44, n. 2, p. 180-197, 2021.

FRANZEN, F. L. et al. Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração. **Acta Iguazu**, v. 7, n. 1, p. 9-21, 2018.

FREITAS, T. R. **Obtenção de derivados semissintéticos do alcaloide (–)-cassina na busca por compostos com potencial antimalárico**. 2018. 310 f. Dissertação (Mestre em Química) – Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia 2018.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 6. ed. São Paulo: Atlas, 2017.

GOMES, N. F. **Triagem fitoquímica e identificação de metabólitos por lc-ms do extrato hidroalcólico das folhas da espécie vegetal *Annona exsucca* DC**. 2017. 53 f. Monografia (Bacharel em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

GOMES, G. C. et al. A crise paradigmática nas ciências de identificação de plantas e a valorização da etnobotânica. **Revista Agrogeoambiental**, v. 9, n. 1, 2017. Disponível em: <https://agrogeoambiental.ifsuldeminas.edu.br/index.php/Agrogeoambiental/article/view/896>. Acessado em 11 de jul. de 2021.

GUERRA, M. R.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicas, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 14-15p.

GUZZI, A. **Biodiversidade do Delta do Parnaíba: litoral piauiense**. – org. Parnaíba: EDUFPI, 2012.

HENRIQUES et al. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 765p.

IINUMA, M. et al. Revised structure of neoflavone in *Coutarea hexandra*. **Phytochemistry**, v. 26, pp. 3096-3097, 1987.

KLOSS, L. C. et al. Identificação de classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper umbellatum* L. (Piperaceae). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 3, n. 2, p. 118-128, 2016.

KORTBEEK, R. W. J.; GRAGT, M. V. D.; BLEEKER, P. M. Endogenous plant metabolites against insects. **European Journal of Plant Pathology**, v. 154, n. 1, p. 67-90, 2019.

KREPSKY, P. B. **Análise fitoquímica preliminar**. 2013. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/130272094/analise-fitoquimica-041112#download>. Acessado em 28 de jan de 2022.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

LIMA, M. F. F. et al. Avaliação toxicológica através do bioensaio com *Artemia salina* Leach de espécimes vegetais pertencentes à caatinga. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 6, p. 5950-5963, 2019.

LIMA, R. A.; MAGALHÃES, S. A.; DOS SANTOS, M. R. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas na cidade de Vilhena, Rondônia/Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the city of Vilhena, Rondônia. **Revista Pesquisa & Criação**, v. 10, n. 2, p. 165-179, 2011.

LIMA, S. F. **Constituintes químicos e avaliação das atividades antioxidante, anticolinesterásica e anti-inflamatória cutânea de *Coutarea hexandra* (Jacq.) k. Schum. (Rubiaceae)**. 2009. 154 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós – Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009.

LOBÃO, A. Q. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Annonaceae. **Rodriguésia**, v. 67, n. 5SPE, p. 1205-1209, 2016.

LOPES, P. F. M.; SILVANO, R.; BEGOSSI, A. Da Biologia a Etnobiologia–Taxonomia e etnotaxonomia, ecologia e etnoecologia. In: **A etnozootologia no Brasil: importância, status atual e perspectivas**. NUPEEA, Recife, p. 69-94, 2010.

LUCENA, J. E. et al. Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato aquoso da entrecasca de *Coutarea hexandra* Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 67-72, 2006.

MACHADO, A. A. et al. Contribuição ao estudo fitoquímico e citotóxico de *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 8, n. 2, p. 1-24, 2011.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARCHINI, H. R. **Extração dos taninos da espécie *Pinus taeda* no município de Curitiba - SC e sua avaliação para aplicação industrial como adesivo modificado**. 2015. 117 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.

MARCUCCI, M. C. et al. Metodologias acessíveis para a quantificação de flavonoides e fenóis totais em própolis. **Rev. Virt. Quím**, v. 13, n. 1, p. 61-73, 2021.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V. et al. **Noções morfológicas e taxonômicas para identificação botânica**. Brasília, DF: Embrapa, 2014.

MARTINS, V. E. X. **Estudo químico e avaliação biológica da *Banisteriopsis malifolia* (Ness & Mart.) *B. gates* (Malpighiaceae)**. 2019. 134 f. Dissertação (Mestrado em química) -

Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. DOI <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.366>.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3ª ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 150p.

McLAUGHLIN, J. L. **In Methods in plant biochemistry**. London: Hostettmann K., Academic Press, p. 1-32, 1991.

MELLITZ, G. M. **A influência dos métodos de extração na quantificação de fenóis totais na casca de *Schinus molle* e *Schinus terebinthifolius***. 2017. 24 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2017.

MENDES, V. C. **Uso de kefir na elaboração de produto biotecnológico utilizando frutas amazônicas**. 2019. 21 f. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Coari – AM, 2019.

MONACHE, G. D. et al. 4-Arylcoumarins from *Coutarea hexandra*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 7, p. 1657-1658, 1983.

MONACHE, G. D.; BOTTA, B.; LIMA, R. A. A 4-arylcoumarin from *Coutarea hexandra*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1813, 1984.

MONACHE, G. D. et al. Isolation from *Coutarea hexandra* and synthesis of exostemin and its methyl ether β . **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 1, n. 2, 1987.

MONACHE, G. D. et al. 4-Arylcoumarins from *Coutarea hexandra*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 12, p. 3984-3986, mar, 1990.

NEUBHAHER, I. Estudo Computacional de Quinonas: a relação dos índices de reatividade de Fukui e potencial redox. In: **V Encontro de Iniciação Científica e Tecnológica-EnICT (ISSN: 2526-6772)**. 2020.

NUNES, L. G. et al. The mutagenic, DNA-damaging and antioxidative properties of bark and leaf extracts from *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 33, n. 2, p. 297-303, dec, 2012.

OBARA, Cássia Emi et al. Propriedades físico-químicas dos estanois e esteróis vegetais. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, v. 29, n. 56, p. 55-60, 2018.

OCAMPOS, F. M. M. **Estudo fitoquímico, toxicológico e avaliação das atividades biológicas da espécie vegetal *Sapium glandulosum* (L.) Morong. (Euphorbiaceae)**. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pósgraduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, 2013.

OLEGÁRIO, M. M. M. et al. **Utilização do tanino vegetal para curtimento de peles: revisão bibliográfica**. 2019. Acessado em 18 de jan de 2022. Disponível em: <http://repositorio.ufersa.edu.br/handle/prefix/4818>.

OLIVEIRA, M. C. C.; BARBOSA, R. C. F.; FLORES, D. C. Atividade antioxidante de frutas cítricas: adaptação do Método do DPPH• para experimentação em sala de aula. **Química Nova Escola**, v. 10, 2021.

OLIVEIRA, M. T. **Quantum chemical explorations into the biosynthesis of pentacyclic triterpene friedelin**. 2019. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

OLMEDO, D. et al. A new coumarin from the fruits of *Coutarea hexandra*. **Natural product research**, v. 21, n. 7, p. 625-631, 2007.

PAES, M. M. et al. Potencial citotóxico das acetogeninas do gênero *Annona*. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 945-980, 2016.

PALENCIA, E. G. E. " **Validación de la actividad antifungica del tuberculo de *Xanthosoma robustus* (quequesque) y determinación de metabolitos secundarios responsables de la actividad**". 2004. 47f. Informe Final de Tesis. Estudiante de la carrera de Química. Facultad de Ciencias Quimicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala, 2004.

PAULA, P. **Análise quantitativa e sazonal de alcaloides por LC-MS/MS e determinação da atividade antiproliferativa em linhagem de carcinoma cervical do extrato hidroalcoólico de folhas de *Annona rugulosa* (SCHLTDL.) H. Rainer**. 2019. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2019.

PEREIRA, A. V. et al. Taninos da casca do Cajueiro: atividade antimicrobiana. **Agropecuária Técnica**, v. 36, n. 1, p. 121-127, 2015.

PEREIRA, I. R. S.; MONTEIRO, I. G.; SIQUEIRA, L. P. Extrato da *Eugenia uniflora* L.(pitangueira) e sua ação anti-inflamatória em afecções dermatológicas–Uma revisão da literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 33630-33645, 2020.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. J. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **J. Biotec. Biodivers**. V. 3. N. 4: pp. 146-152, 2012.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

POZZI, A. C. S. **Desenvolvimento de métodos de análise Espectrofotométrica de flavonoides do “maracujá” (*Passiflora alata* e *Passiflora edulis*)**. 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

REHER, G. et al. A neoflavanoid from *Coutarea hexandra* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 1524-1525, 1983.

RIBEIRO, B. D. **Estratégias de processamento verde de saponinas da biodiversidade brasileira**. 2012. 187 f. Tese (Doutorado em ciências) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

RIBEIRO, C. B. **Avaliação de parâmetros metabólicos em indivíduos prédiabéticos suplementados com flavonoides cítricos**: Ensaio clínico paralelo, duplo-cego, randomizado, placebo-controlado. 2019. 68 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação Em Alimentos e Nutrição. Araraquara, 2019.

ROLIM, R. G.; REIS, C. R. M. CAPÍTULO III – Espécies Frutíferas. In: ROLIM, R. G. et al. Flora da bacia do rio Pelotas: uso e conservação de espécies. 1 ed. Porto Alegre: **UFRGS**, 2016.

SANTIAGO, M. C. P. A. et al. Análise e caracterização de taninos condensados por cromatografia líquida. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 61446-61462, 2020.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 711p.

SENIGALIA, R. L. C. et al. Toxicidade de extratos vegetais de plantas do cerrado de uso medicinal. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 55308-55317, 2020.

SILVA, C. **Atividade antioxidante e citotóxica do extrato e frações das folhas de *Syzygium malaccense* em células de melanoma cutâneo**. 2021. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2021.

SILVA, C. C. et al. Atividade antibacteriana de novas 2-amino-1,4-naftoquinonas. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 6, p. 54215-54229, jun. 2021.

SILVA, H. H. G. et al. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil.(Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 396-399, 2004.

SILVA, J. A. et al. **Determinação qualitativa de flavonoides nos extratos das cascas do caule da *Prosopis juliflora***. Trabalho SEMIC do Instituto Federal De Educação, Ciência e Tecnologia Do Ceará – IFCE, 2016. Disponível em: http://prpi.ifce.edu.br/nl/_lib/file/doc1066-Trabalho/Trabalho%20SEMIC%202016%20%28Jessica%29.pdf. Acessado em 28 de jan de 2022.

SILVEIRA, A. C. M. **Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos in vitro de *Passiflora suberosa* L.**. 2019. 68 f. Dissertação (Mestrado em Conservação e Utilização da Biodiversidade) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 470p.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8 ed. Thomson, 2010.

SOARES, K. V. C. **Estudo da composição química e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos das folhas de *Piper arboreum* e *Piper aduncum***. 2020. 90 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUSA, E. A.; CHAVES, M. H. Iridoides e atividades biológicas de espécies da tribo Gardenieae: uma contribuição quimiotaxonômica para a família Rubiaceae. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 6, 2019.

SOUSA, I. J. O. et al. A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde. **Revista UNINGÁ Review**, v. 31, n. 1, 2017.

SOUZA, A. L. C. **Análise fitoquímica e atividades farmacológicas da espécie *Vachellia farnesiana* (L.) Wight & Arn. [sin. *Acacia farnesiana* (L.) Willd.]**. 2019. 76 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Licenciatura em Química) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – IFPI, Parnaíba, 2019.

SOUZA, M. M. S. **Contribuição ao conhecimento fitoquímico da planta do nordeste brasileiro: Salsa-brava (*Ipomoea indica*)**. 2017. 124 f. Dissertação (Mestrado em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis) – Instituto de Engenharia de Desenvolvimento Sustentável – IEDS da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, Redenção, 2017.

SUFFNESS, M. et al. The utility of P388 leukemia compared to B16 melanoma and colon carcinoma 38 for *in vivo* screening of plant extracts. **Phytotherapy research**, v. 2, pp. 89-97, 1988.

TANANTA, F. V. Estudo fitoquímico de *Duroia macrophylla* Huber (rubiacae). In: **I Congresso de Iniciação Científica PIBIC/CNPq-PAIC/FAPEAM**. 2012.

TERRA JUNIOR, O. N.; MALDONADO, J.; ARNÓBIO, A. Estudo do desempenho comercial dos insumos farmacêuticos vegetais sob a ótica do comércio exterior. **Revista Fitos**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 233-246, 2015.

TORRES, Daniel da S. et al. Influência do método extrativo no teor de flavonoides de *Cnidioscolus quercifolius* POHL (Euphorbiaceae) e atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 41, p. 743-747, 2018.

VASCONCELOS, A. **Atividade antioxidante de chalconas derivadas do 2-acetil-tiofeno**. 2012. 62 f. Dissertação (Mestre em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2012.

VENDRAMIN, M. E. et al. Chemical constituents from the leaves of *Annona rugulosa* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 49, p. 152-155, mar, 2013.

VIEIRA, M. M. S.; BEZERRA, J. M.; DOS SANTOS, A. F.. Avaliação dos compostos bioativos e capacidade antioxidante em cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) imaturo cru, cozido e seus caldos de cocção. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e3710716243-e3710716243, 2021.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. **Embrapa Clima Temperado Pelotas**, 2010. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/886074>. Acessado em 17 de nov. de 2021.

WANG, Z.; FANG, C.; MALLAVARAPU, M. Characterization of iron–polyphenol complex nanoparticles synthesized by Sage (*Salvia officinalis*) leaves. **Environmental technology & innovation**, v. 4, p. 92-97, 2015.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.